



Influence de la température sur la réponse de communautés microbiennes périphytiques à une exposition métallique : cas du cuivre

Anne-Sophie Lambert

► To cite this version:

Anne-Sophie Lambert. Influence de la température sur la réponse de communautés microbiennes périphytiques à une exposition métallique : cas du cuivre. Ecosystèmes. Université Claude Bernard - Lyon I, 2015. Français. NNT : 2015LYO10235 . tel-01299788

HAL Id: tel-01299788

<https://theses.hal.science/tel-01299788>

Submitted on 8 Apr 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



N° d'ordre 235-2015

Année 2015

THESE

Délivrée par

L'Université Claude Bernard Lyon I

Ecole doctorale Evolution, Ecosystèmes Microbiologie et Modélisation (E2M2)
Spécialité Ecologie des communautés, fonctionnement des écosystèmes et écotoxicologie

Thèse préparée au sein du laboratoire d'Ecologie Microbienne des Hydrosystèmes Anthropisés (EMHA),
Unité de recherche des Milieux Aquatiques, Ecologie et Pollutions (UR MALY),
Irstea Lyon-Villeurbanne

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté ministériel du 7 août 2006)

Anne-Sophie LAMBERT

Influence de la température sur la réponse de communautés microbiennes périphytiques à une exposition métallique : cas du cuivre

Thèse soutenue publiquement le **27 novembre 2015**, devant le jury composé de :

Annette BÉRARD

ICPEF HDR, UMR EMMAH, INRA Avignon, France, *Rapporteur*

Sergi SABATER

PR, ICRA-Université de Girona, Espagne, *Rapporteur*

Vera SLAVEYKOVA

PR, Institut F.-A. Forel-Université de Genève, Suisse, *Examinatrice*

Olivier CROUZET

CR, UMR EcoSys, INRA Versailles, France, *Examineur*

Agnès RICHAUME

PR, UMR LEM, Université Claude Bernard Lyon I, France, *Examinatrice*

Marina COQUERY

DR, UR MALY, Irstea Lyon-Villeurbanne, France, *Directrice de thèse*

Stéphane PESCE

CR HDR, UR MALY, Irstea Lyon-Villeurbanne, France, *Co-encadrant de thèse*

Aymeric DABRIN

CR, UR MALY, Irstea Lyon-Villeurbanne, France, *Co-encadrant de thèse*

Remerciements

Je souhaiterais tout d'abord remercier profondément ma directrice de thèse, Marina Coquery, pour sa gentillesse, son soutien et tous ses bons conseils. Marina, merci d'avoir reconnu mes efforts et mes difficultés ! Je remercie également mes deux co-encadrants, Aymeric Dabrin et Stéphane Pesce. Aymeric pour sa patience exemplaire, car il n'était pas simple de m'inculquer les outils et les bases de chimie nécessaires à la bonne compréhension de mon sujet de thèse. Aymeric, merci pour tous les vendredis que tu m'as consacrés ! Je tiens à remercier infiniment Stéphane Pesce, mon encadrant de toujours, pour sa confiance et la relation que nous avons développée depuis mon stage de Master. Stéphane, je te remercie de m'avoir dirigée et encouragée à passer au doctorat, car ce n'était pas gagné d'avance ! Je te remercie également de m'avoir poussée dans mes retranchements (et je ne parle pas de prendre l'avion, qu'est-ce que tu ne m'as pas fait faire !). Je souhaite à bon nombre d'étudiants de croiser ton chemin, car il est bien rare aujourd'hui de rencontrer des personnes aussi généreuses que toi. Je remercie tous les chimistes pour leur soutien analytique, et plus particulièrement Josiane Gahou, pour son aide précieuse, et l'immense travail accompli à mes côtés. Je ne pourrai jamais remercier assez les membres de mon équipe, l'équipe EMHA, Bernard Motte, Christophe Rosy et Bernadette Volat, pour leur appui technique, sans lequel je n'aurais jamais pu entreprendre de telles expérimentations ! Oh quelle équipe ! En plus d'avoir enrichi mes connaissances techniques et scientifiques, vous m'avez appris, comme promis à mon arrivée dans vos laboratoires, la vie ! En effet, un doctorat, c'est bien plus qu'une première expérience professionnelle, c'est un réel apprentissage de la vie ! La petite Anne-So-So a bien grandi sous votre protection, et si elle est devenue une grande fille aujourd'hui, elle le doit en partie à ses parents mais également à vous, qui avez pris le relais pendant près de 5 ans et qui avez pris soin d'elle comme votre propre fille ou votre propre sœur. Aujourd'hui, elle est très fière de dire qu'elle a également de la famille à Lyon !

Je remercie également mes deux grands modèles statisticiens, Arnaud Foulquier, pour ses conseils en analyse statistique. Merci d'avoir fait de moi une petite « Bieber » en herbe !. Je remercie également Simon Navel, pour avoir pris le relais, et m'avoir aidée dans mes analyses de données. Merci, Simon, de m'avoir si gentiment accueilli dans ton bureau et pour tous ces bons moments de rigolade partagés. Je remercie Gilles Armani pour sa grande ouverture d'esprit, et pour toutes les grandes conversations que nous avons eues ensemble. Je

remercie mes collègues doctorantes et post-doctorantes, Nastassia Urien, pour m'avoir écouté râler dans son bureau et pour son soutien dans les dernières épreuves, Armelle Autret, pour son soutien à distance et Aurélie Magnier, pour ses encouragements. J'en profite également pour remercier l'ensemble de l'équipe HBAN du centre Irstea d'Antony, Lise Fechner, Jeremie Lebrun et Emmanuelle Uher, pour m'avoir si gentiment accueillie dans leurs laboratoires. Je remercie aussi tous les membres de mon comité de pilotage, Renata Behra, Patrice Gonzalez, Marie-Louise Tercier-Waeber et Aurélie Tournon-Bodilis pour leurs conseils avisés et leurs encouragements. Je remercie plus particulièrement Patrice Gonzalez, ainsi que toute son équipe, pour m'avoir accueillie et formée dans leurs laboratoires de la station Marine d'Arcachon. Je remercie également de tout cœur Soizic Morin, pour les analyses taxonomiques diatomiques qu'elle a effectuées. Je n'ose compter le nombre d'échantillons qu'elle a analysés pour moi depuis mon stage de Master. Je tiens également à remercier tout le personnel d'appui à la recherche du centre Irstea de Lyon-Villeurbanne, et en particulier Christèle Rothé et Véronique Delamir, mes petites mamans du coin café. Je remercie également Anne-Laure Achard pour tous les bons moments passés ensemble. Je tiens aussi à remercier sincèrement les membres du jury, Annette Bérard, Olivier Crouzet, Sergi Sabater, Agnès Richaume et Vera Slaveykova, d'avoir pris le temps d'évaluer mon travail de thèse.

Je finirai par remercier mon conjoint, Frédéric Ab Der Halden, pour m'avoir supportée « *in situ* » pendant les dernières phases de mon doctorat et non les moins dures ! Merci de m'avoir fait confiance, de m'avoir soutenue dans les choix que j'ai pris et d'avoir attendu patiemment mon retour. J'espère que mon amour suffira à rembourser tous tes allers-retours en TGV. Merci à ma meilleure amie Leïla Renane, pour son soutien et ses encouragements, notamment avant chaque communication orale. Et enfin, je remercie profondément mes parents d'avoir cru en mes capacités et pour l'amour incommensurable qu'ils me portent.

Je dédie ce manuscrit

*À mes chers parents, qui ont toujours cru en moi
À la mémoire d'Olivier Bianco, envers qui, il m'était interdit de baisser les bras*

« Qui donne ne doit jamais s'en souvenir.

Qui reçoit ne dois jamais oublier. »

Proverbe hébreux

Je n'oublierai jamais

Résumé

De nombreux cours d'eau sont exposés aux polluants métalliques. Dans ces milieux, les communautés microbiennes structurées sous forme de biofilms peuvent être affectées par ces polluants. Or, une des questions prégnantes en écotoxicologie concerne l'évaluation des impacts toxiques dans le cas de combinaisons multi-stress.

Dans ce contexte, l'objectif principal de ce travail était d'évaluer l'influence de la température sur la réponse du biofilm à une exposition au cuivre (Cu). Cet objectif a été abordé en considérant l'influence de la température, d'une part, sur la sensibilité des communautés au Cu, et d'autre part, sur l'exposition des communautés de biofilm à ce métal. Ces travaux ont été réalisés en microcosmes de laboratoires et menés sur des biofilms prélevés à différentes saisons. Nous avons tout d'abord optimisé les protocoles utilisés pour mesurer i) les niveaux de tolérance des communautés au Cu et ii) la bioaccumulation du Cu dans les biofilms. Les résultats des expérimentations ont révélé que la température pouvait moduler l'impact structural et fonctionnel du Cu sur les biofilms, du fait notamment d'une diminution de la bioaccumulation aux plus fortes températures. En complément, les résultats ont mis en évidence l'influence d'une hausse de la température sur la sensibilité des communautés au Cu, qu'elles aient été préalablement exposées (PICT) ou non à ce métal.

Cependant, nous avons observé que les effets de la température sur la réponse du biofilm étaient variables d'une étude à l'autre, suggérant une influence de nombreux paramètres, tels que la composition initiale de la communauté, les niveaux de stress appliqués (température et Cu), le compartiment microbien étudié (phototrophe ou hétérotrophe), ou les fonctions considérées.

Mots clés : Bioaccumulation ; Biofilms ; Communautés microbiennes ; Cuivre ; Écotoxicologie microbienne ; Métal ; Périphyton ; Pollution Induced Community Tolerance (PICT) ; Température.

Abstract

Many streams are impacted by metallic pollution. In such ecosystems, microbial communities, which grow preferentially as biofilms, can be affected by these pollutants. However, there is a need to better assess the impact of toxic substances under multi-stress interactions.

In this context, the main aim of this work was to evaluate the effect of temperature on biofilm response to copper (Cu) exposure. Accordingly, we addressed the influence of temperature on microbial community sensitivity to Cu on the one hand, and its influence on biofilm exposure to this metal on the other hand. Microcosm experiments were performed under laboratory conditions using biofilms sampled in winter or summer. This work allowed us to set up new methodological developments, which were applied to improve the protocols used to measure (i) Cu tolerance levels of biofilm microbial communities and (ii) Cu bioaccumulation in biofilms. Results showed that temperature could modulate structural and functional effects of Cu on biofilms, notably due to a decrease in Cu bioaccumulation at higher temperatures. In addition, our findings indicate that temperature increase could influence the sensitivity of microbial communities to Cu, whether they have been previously chronically exposed (PICT) or not to this metal.

Nonetheless, temperature effects on biofilms varied among experiments, revealing that the influence of temperature on the effects of Cu on microbial biofilms depends on many parameters, such as the initial composition of communities, the level of the applied stresses (temperature and Cu), the microbial compartment studied (i.e. phototrophic or heterotrophic), or the measured functional parameters.

Key words: Bioaccumulation; Biofilms; Copper; Microbial community; Microbial ecotoxicology; Pollution Induced Community Tolerance (PICT); Temperature.

SOMMAIRE

Introduction générale.....	1
1. Cadre général et problématique.....	3
2. Objectifs de la thèse.....	5
3. Présentation du manuscrit.....	7
 Chapitre I : État des connaissances.....	11
1. Le biofilm, une structure microbienne dynamique et un acteur écologique majeur du fonctionnement des cours d'eau	13
1.1. Définition, formation, structure et fonctionnement du biofilm	13
1.2. Fonctions du biofilm microbien dans les cours d'eau.....	17
2. Le cuivre, usage agricole, devenir dans l'environnement et impacts sur le biofilm.....	20
2.1. De l'utilisation du cuivre en agriculture à la contamination des cours d'eau.....	20
2.2. Spéciation et biodisponibilité.....	21
2.3. Effets et réponse du biofilm au cuivre.....	26
3. La température, un paramètre environnemental majeur à prendre en compte dans l'évaluation de la réponse du biofilm à une exposition métallique	36
3.1. Influence des paramètres environnementaux sur la sensibilité des communautés microbiennes aquatiques à l'exposition métallique.....	36
3.2. Influence de la température sur la réponse des microorganismes aquatiques à l'exposition métallique.....	37
 Chapitre II : Matériel et méthodes.....	41
1. Procédures expérimentales.....	43
1.1. Site de prélèvement du biofilm.....	43
1.2. Système expérimental et protocoles de préparation des expérimentations.....	44
1.3. Stratégie expérimentale générale.....	47
2. Caractérisation physico-chimique du milieu d'exposition et des biofilms.....	50
2.1. Paramètres généraux.....	50
2.2. Évaluation du niveau d'exposition au cuivre.....	51
3. Caractérisation de la réponse du biofilm.....	54
3.1. Méthodes d'analyse de la réponse structurale des communautés phototrophes...54	
3.2. Méthodes d'analyse de la réponse fonctionnelle des communautés phototrophes : mesure de l'efficacité photosynthétique.....	57
3.3. Évaluation de la sensibilité du biofilm au cuivre par approche « PICT ».....	57

4. Analyses statistiques.....	61
-------------------------------	----

Chapitre III : Influence de la température sur la réponse structurale et fonctionnelle de communautés microbiennes phototrophes hivernales à une exposition chronique au cuivre.....65

1. Introduction.....	67
2. Temperature modulates phototrophic periphyton response to chronic copper exposure.....	69
2.1. Introduction.....	71
2.2. Materials and methods.....	73
2.3. Results.....	76
2.4. Discussion.....	85
2.5. Conclusion.....	89
3. Conclusion.....	91

Chapitre IV : Développements méthodologiques pour évaluer la sensibilité des communautés phototrophes de biofilms au cuivre.....95

1. Introduction.....	97
2. Improves short-term toxicity test protocol to assess metal tolerance in phototrophic periphyton : Toward standardization of PICT approaches.....	103
2.1. Introduction.....	105
2.2. Materials and méthodes.....	107
2.3. Results and discussion.....	110
3. Influence of temperature on pollution induced communitiy tolerance approaches used to assess effects of copper on freshwater phototrophic periphyton.....	117
3.1. Introduction.....	119
3.2. Material and methods.....	121
3.3. Results and discussion.....	127
3.4. Conclusions.....	136
4. Conclusions.....	139

Chapitre V : Développements méthodologiques en vue d'évaluer le rôle de la matière organique d'origine microbienne dans l'exposition des communautés de biofilm au cuivre : Influence de la matrice « EPS ».....143

1. Contexte et objectifs des développements méthodologiques.....145
2. Stratégie expérimentale.....146
3. Développement d'une méthode d'analyse des concentrations en cuivre complexé avec la matrice « EPS » et internalisé.....151

Chapitre VI : Influence de la température sur la sensibilité et l'exposition des communautés de biofilm au cuivre : comparaison de la réponse des communautés phototrophes et hétérotrophes.....155

1. Introduction.....157
2. A PICT approach to assess the influence of temperature on the sensitivity of phototrophic and heterotrophic periphytic communities to copper...159
 - 2.1. Introduction.....161
 - 2.2. Material and methods.....163
 - 2.3. Results.....169
 - 2.4. Discussion.....177
 - 2.5. Conclusion.....181
3. Conclusions.....182
4. Résultats exploratoires complémentaires.....185

Chapitre VII : Discussion générale et perspectives.....189

1. Discussion générale.....191
 - 1.1. Apports des développements méthodologiques.....191
 - 1.2. La température, un paramètre environnemental qui influence les effets du cuivre sur les communautés phototrophes de biofilm.....192
2. Perspectives.....200
 - 2.1. Evaluation de la tolérance des communautés aux contaminants, dans un contexte multistress.....200
 - 2.2. Evaluation de l'exposition des communautés aux contaminants, dans un contexte multistress.....203

Bibliographie.....207

Annexes.....245

LISTE DES FIGURES

Figure I.1. Les 4 grandes étapes de la formation du biofilm.....	15
Figure I.2. Structure théorique d'un biofilm de rivière.....	17
Figure I.3. Processus clés qui déterminent la biodisponibilité d'un métal à proximité d'un organisme. Exemple d'une microalgue d'eau douce.....	23
Figure I.4. Distribution des principales espèces inorganiques du Cu en fonction du pH, en milieu d'eau douce.....	24
Figure I.5. Principaux processus qui contrôlent la spéciation du Cu (en rouge), du Pb (en bleu clair) et du Cd (en bleu foncé). Exemple de la rivière Riou-Mort (France).....	24
Figure I.6. Évolution des concentrations en Cu, Zn et Mn dissous mesurées dans un ruisseau de montagne (Fisher Creek, Montana, États-Unis) en fonction des variations de températures et de pH relevées sur 24 h.....	26
Figure I.7. Courbes doses-réponses.....	30
Figure I.8. Principe du concept « PICT ».....	30
Figure I.9. Les interactions métal-EPS. Exemple de la cellule bactérienne.....	33
Figure II.1. Localisation des trois principales stations d'échantillonnage sur le bassin versant de la Morcille, dont celui de Saint-Joseph, site de prélèvement du biofilm choisi dans le cadre de notre étude.....	44
Figure II.2. Système expérimental représentant deux bacs de rétention thermorégulés (i.e. deux températures testées) avec leurs microcosmes (au-dessus), et schématisation des microcosmes disposés dans ces deux bacs de rétention (en-dessous).....	45
Figure II.3. Lames de verre disposées sur une réglette et colonisées par le biofilm.....	45
Figure II.4. Calendrier expérimental général.	47
Figure II.5. Structure d'un frustule.....	56
Figure III.1. Mean dissolved Cu concentrations ($\mu\text{g L}^{-1}$) measured in each control and Cu microcosm between week 2 and week 6.....	78
Figure III.2. Time-course of concentrations (mean \pm s.d ; $n=3$) of chlorophyll <i>a</i> (Chl <i>a</i> , $\mu\text{g cm}^{-2}$) between week 2 and week 6 in control and Cu microcosms incubated at 8°C (A), 13°C (B), 18°C (C) and 23°C (D).....	79
Figure III.3. Two-dimensional plot of the non-metric multidimensional analysis using diatom assemblage composition (microscopic taxonomic identification) in the different microcosms at week 6 for control and Cu communities.....	83

Figure III.4. Time-course of PSII yield (mean \pm s.d, in relative unit ; $n=3$) between week 2 and week 6 in control and Cu microcosms incubated at at 8°C (A), 13°C (B), 18°C (C) and 23°C (D).....	84
Figure III.5. Mean (\pm s.d ; $n=3$) extracellular and intracellular Cu concentrations in periphyton ($\mu\text{g g}^{-1}$ dry weight) at week 6 in the 4 Cu microcoms incubated at 8°C, 13°C, 18°C and 23°C.....	85
Figure IV.1. Stratégie expérimentale : paramètres testés au cours de la phase de détection de la méthode « PICT », réalisée à une température d'incubation de 23°C (article 2).....	99
Figure IV.2. Stratégie expérimentale : températures testées au cours de la phase de sélection et de détection de la méthode « PICT » (article 3).....	101
Figure IV.3. Linear relationship between mean chl <i>a</i> concentrations in periphyton suspension ($\mu\text{g L}^{-1}$) and (a) mean EC ₅₀ and (b) mean EC ₁₀ (mg Cu L^{-1}) during toxicity tests performed with a 3- and 5-week periphyton after 2 h of incubation.....	112
Figure IV.4. Mean (\pm s.d ; $n=3$) for (a) EC ₅₀ and (b) EC ₁₀ (mg Cu L^{-1}) for periphyton suspension concentrations, ranging from about 400 $\mu\text{g chl a L}^{-1}$ (D4) to about 7000 $\mu\text{g chl a L}^{-1}$ (D1) during toxicity tests performed with a 3- and 5-week periphyton after 2 h of incubation.....	113
Figure IV.5. Linear relationship between chl <i>a</i> ($\mu\text{g/sample}$) and DW (mg/sample) obtained with 5-week periphyton.....	116
Figure IV.6. Experimental strategy : temperature applied during selection (i.e., growth temperature) and detection (i.e., short-term incubation temperature) phases of PICT method.....	122
Figure IV.7. Mean concentrations (\pm s.d ; $n=3$) of chlorophyll <i>a</i> (chl <i>a</i> , $\mu\text{g cm}^{-2}$) of Control and Cu exposed communities at week 3 and 5, for 18°C and 28°C growth temperature.....	128
Figure IV.8. Cellular density (mean \pm s.d ; cells cm^{-2} ; $n=3$) of live diatoms and other microalgae of Control and Cu-exposed communities at week 3 and 5 for 18°C and 28°C growth temperature.....	129
Figure IV.9. PSII yield (mean \pm s.d, in relative unit ; $n=3$) of Control and Cu-exposed communities at week 3 and 5 for 18°C and 28°C growth temperature.....	130
Figure IV.10. Dose-response curves showing inhibition of PSII yield with increasing concentrations of copper for Control and Cu-exposed communities, at week 3 (a) and week 5 (b), respectively.....	135
Figure IV.11. Protocole optimisé des tests de toxicité aiguë (phase de détection de l'approche « PICT »), permettant d'évaluer la sensibilité des communautés phototrophes de biofilm au Cu, sur la base de la mesure de l'efficacité photosynthétique.....	140
Figure V.1. Comparaison de la méthode décrite dans l'étude d'Aguilera <i>et al.</i> (2008) et de la méthode interne.....	148
Figure V.2. Description des 4 protocoles, testés au cours de développements méthodologiques.....	149

Figure V.3. Calendrier expérimental.....	150
Figure V.4. Concentrations moyennes en Cu ($\mu\text{g g}^{-1}$ ps ; $n=3$) mesurées dans les différentes fractions ciblées, obtenues selon le protocole 1 (A), le protocole 2 (B), le protocole 3 (C) et le protocole 4 (D).....	152
Figure V.5. Schématisation des différentes fractions du biofilm dans lesquelles sont mesurées les concentrations en Cu, à l'aide du protocole 3.....	153
Figure VI.1. Mean (\pm s.d ; $n=3$) dissolved Cu concentrations ($\mu\text{g L}^{-1}$) measured in each Cu-exposed microcosm between week 2 and week 4.....	169
Figure VI.2. Mean (\pm s.d ; $n=3$) intracellular, capsular and colloïdal Cu concentrations in periphyton ($\mu\text{g g}^{-1}$ dry weight) at week 4, in the 3 Cu-exposed microcosms incubated at 18°C, 23°C and 28°C.....	170
Figure VI.3. Time-course of concentrations of chlorophyll <i>a</i> (mean \pm s.d, $\mu\text{g cm}^{-2}$; $n=3$) (A) and PSII yield (mean \pm s.d, in relative unit ; $n=3$) (B) between week 2 and week 4 in Control and Cu-exposed microcosms, incubated at 18°C, 23°C and 28°C.....	173
Figure VI.4. Boxplot of EC ₅₀ values (mg Cu L^{-1}) determined for phototrophic communities, based on photosynthetic yield, at 3-week (A) and 4-week (B), after a 2 h 30 acute exposure.....	175
Figure VI.5. Boxplot of EC ₅₀ values (mg Cu L^{-1}) determined for heterotrophic communities at 4-week, based on β -glucosidase (A) and Lap (B) activities, after a 2 h 40 acute exposure.....	176
Figure VII.1. Bilan des résultats obtenus sur l'influence de la température sur la réponse des communautés phototrophes de biofilm hivernal au Cu.....	198
Figure VII.2. B Bilan des résultats obtenus sur l'influence de la température sur la réponse des communautés phototrophes et hétérotrophes de biofilm estival au Cu.....	199
Figure VII.3. Adsorption du Cu à la surface d'une diatomée de biofilm de rivière, vue par STXM.....	205

LISTE DES TABLEAUX

Tableau II.1. Caractéristiques physico-chimiques des eaux utilisées lors des expérimentations en microcosmes, et de l'eau du site de prélèvement du biofilm.....	46
Tableau II.2. Stratégie d'étude adoptée pour chaque expérimentation.....	49
Tableau II.3. Normes des mesures des concentrations en éléments majeurs.....	51
Tableau II.4. Analyses statistiques réalisées et logiciels utilisés, en fonction du paramètre considéré.....	62
Table III.1. Physical-chemical characteristics (mean values of weekly samples \pm standard deviation (s.d.)) of water in the 8 experimental conditions before (i.e. conditions after 1 week) and 2 h (i.e. initial conditions) after each water renewal during 6 weeks (weeks 0, 2, 3, 4, 5 and 6).....	77
Table III.2. Time-course of the distribution of different algal classes (cyanobacteria, green algae and diatoms) between week 2 and week 6 in control and Cu microcosms incubated at 8°C, 13°C, 18°C and 23°C.....	81
Table IV.1. Mean (\pm s.d ; $n=3$) EC ₅₀ and EC ₁₀ (mg Cu L ⁻¹) for periphyton suspension concentrations, ranging from about 400 μ g chl <i>a</i> L ⁻¹ (D4) to 7000 μ g chl <i>a</i> L ⁻¹ (D1) after 2, 4 and 6 h of incubation.....	111
Table IV.2. Physico-chemical characteristic of water in the Control and Cu microcosms for the 4 tested conditions before (i.e. conditions after 1 week) and 2 h (i.e. initial conditions) after each water renewal during 5 weeks (mean value \pm standard deviation, s.d ; $n=3$).....	124
Table IV.3. Tolerance measurements : summary of parameters derived from dose-response curves obtained from short-term bioassays for Control and Cu-exposed communities microcosms.....	132
Table VI.1. Physico-chemical characteristic of water in the 6 tested conditions before (i.e. conditions after 1 week) and 2 h (i.e. initial conditions) after each water renewal during 4 weeks (mean value of weekly samples \pm standard deviation, s.d ; $n=3$).....	164
Table VI.2. Mean relative abundances (\pm sd ; $n=3$), at week 4, of the 17 dominant diatom species, for the inoculum and the 6 exposure contexts (thermal and exposure context) (i.e. representing more than 3% relative abundances in at least one sample).....	172
Tableau VI.3. Facteurs d'induction et de répression de l'expression des différents gènes, impliqués dans le métabolisme photosynthétique (psA1 ; d1) et mitochondrial (nd5 ; cox1 ; sodMn) des diatomées, pour les trois contextes thermiques testés, après 3 semaines d'exposition au Cu.....	186

Introduction générale

1. Cadre général et problématique

La mise en œuvre de la directive cadre sur l'eau (DCE) du 23 octobre 2000 (DCE, 2000/60/CE), qui vise à atteindre ou à préserver le bon état des eaux et des milieux aquatiques, se traduit entre autres par une intensification des actions de surveillance des écosystèmes aquatiques, *via* notamment un renforcement des suivis des niveaux de contamination chimique. Malgré la mise en place d'une telle réglementation, les pesticides organiques (constitués d'éléments carbonés naturels ou synthétiques) et inorganiques (dérivés de minéraux, en particulier les métaux) restent des polluants chimiques préoccupants dans les cours d'eau. C'est le cas, par exemple, dans de nombreuses zones agricoles où les cours d'eau se retrouvent fortement exposés aux pesticides, du fait d'une pollution diffuse provoquée par le transfert de ces polluants sur les bassins versants. Ainsi, les petits cours d'eau qui drainent des bassins versants, avec une forte pression de l'activité viticole, se retrouvent particulièrement exposés au cuivre, du fait de son utilisation intensive comme fongicide dans la viticulture conventionnelle et biologique.

Dans les milieux lotiques, les communautés microbiennes se structurent principalement sous forme d'agrégats, appelés « biofilm » ou encore « périphyton », composés de microorganismes phototrophes (microalgues et cyanobactéries) et hétérotrophes (bactéries, champignons et protozoaires). Ces biofilms jouent un rôle clé dans différents processus écologiques, comme la production primaire, la dégradation de la matière organique ou encore le recyclage des nutriments (Battin *et al.* 2003). Ainsi, ils participent activement à l'autoépuration des rivières et à la production de biomasse dans les réseaux trophiques.

Cependant, et du fait de leur forte interaction avec les substances dissoutes, les biofilms peuvent être affectés par les pollutions chimiques, telles que les pollutions métalliques. Cet impact peut se traduire par des modifications structurales et fonctionnelles au sein des communautés microbiennes, pouvant conduire à un dysfonctionnement des processus microbiens. Un tel impact peut donc potentiellement engendrer une perturbation du fonctionnement écologique des cours d'eau contaminés. Il est donc important de mieux évaluer l'impact et le risque écotoxicologique des métaux sur les biofilms. De par le niveau d'organisation biologique des biofilms, qui rassemblent différentes espèces, présentant des modes de fonctionnement variés (phototrophes, hétérotrophes ou mixotrophes), une évaluation de cet impact au travers de ce compartiment permet d'aborder les effets écotoxicologiques en considérant la notion de biodiversité structurelle et fonctionnelle, tout en tenant compte des effets indirects qui découlent des interactions multiples entre les

microorganismes qui les composent. La complexité biologique au sein des biofilms confère ainsi une dimension écologique non négligeable aux approches écotoxicologiques réalisées à partir de ce modèle d'étude (Geizinger *et al.* 2009).

De nombreuses études ont mis en évidence les effets des métaux, tel que le cuivre, sur la structure et le fonctionnement des biofilms (ex. Serra and Guasch, 2009 ; Lambert *et al.* 2012). Or, la contamination des milieux aquatiques s'inscrit dans un contexte multistress, qui découle de la multiplicité des pressions chimiques, climatiques et/ou physiques. Dans ce contexte, il a été montré que les effets des métaux sur les communautés microbiennes aquatiques étaient modulés par différents paramètres environnementaux, qu'ils soient naturels, comme le débit de l'eau et l'intensité lumineuse, ou d'origine anthropique, comme les concentrations en phosphates, ou encore la présence d'autres toxiques (ex. Sabater *et al.* 2002 ; Guasch *et al.* 2004).

Afin de mieux évaluer les impacts et appréhender le risque environnemental lié à une contamination au cuivre, il apparaît donc nécessaire de mieux comprendre l'influence de ces paramètres sur les effets écotoxicologiques des polluants métalliques. Cet objectif s'inscrit clairement dans la feuille de route rédigée par l'Initiative Française pour la Recherche en Environnement Santé (IFRES) en 2012, qui propose de faire évoluer les approches écotoxicologiques actuelles, au profit d'une nouvelle vision plus intégrée qui vise à mieux prendre en compte l'ensemble des expositions. L'objectif général est ainsi de passer d'une approche fragmentée par contaminant et par stress, à une approche intégrée de l'ensemble des expositions et des stress. Cela implique d'aborder progressivement les effets multistress sur les écosystèmes. Ainsi, une meilleure connaissance des interactions paramètres environnementaux/métaux permettrait de mieux évaluer le risque écotoxicologique associé à ces contaminants et de mieux caractériser les relations de cause à effet dans les études d'impact, en permettant de mieux établir le lien entre le stress provoqué par les métaux et les effets écologiques observés *in situ*.

Avec une augmentation moyenne des températures de près de 1°C au cours des 100 dernières années, notre planète est soumise à des modifications climatiques rapides et importantes (Acuña *et al.* 2008). Cette évolution tend à s'accélérer et différents scénarios prédisent, dans le meilleur des cas, une augmentation comprise entre 1 et 2°C d'ici 2100, avec un risque d'observer une augmentation comprise entre 3,5 et 5°C pour un scénario de fortes émissions de gaz à effet de serre, si aucune mesure n'est prise (IPCC, 2014). Outre cette hausse progressive de la température, le réchauffement climatique favorise les événements météorologiques extrêmes, qui peuvent engendrer une augmentation ponctuelle et brutale des

températures. De ce fait, la température est un paramètre environnemental majeur à prendre en compte dans les études multistress. Or, si l'évaluation de l'influence des caractéristiques physico-chimiques du milieu aquatique, telles que les conditions hydrodynamiques et nutritives sur la toxicité métallique, fait l'objet d'un nombre croissant d'études (Sabater *et al.* 2002 ; Serra *et al.* 2010), il existe un réel déficit de connaissance concernant l'influence de la température sur les effets des métaux sur les communautés microbiennes aquatiques (Boivin *et al.* 2005).

Les variations de la température des eaux de surface peuvent engendrer un impact biologique direct sur la diversité et les capacités métaboliques des communautés aquatiques (Wilby, 2008). Elles peuvent donc affecter la structure et l'état physiologique des biofilms, ce qui peut, dans un contexte de pollution métallique, conditionner leur niveau de sensibilité à ces contaminants. En complément, l'impact de la température sur les biocénoses aquatiques et sur les propriétés physico-chimiques du milieu peut également entraîner une modification de la biodisponibilité des métaux, ce qui peut moduler leurs effets écotoxicologiques (Sigg and Xue, 1994; Campbell, 1995). À ce jour, les effets cumulés d'une pollution métallique et d'une augmentation de la température dans les milieux aquatiques ont été essentiellement appréhendés sur des macroorganismes (ex : poissons, macroinvertébrés) à partir d'études essentiellement réalisées à l'échelle de la population (Heugens *et al.*, 2001; Holmstrup *et al.*, 2010). Il apparaît donc nécessaire d'intensifier les efforts de recherche pour mieux évaluer l'influence de la température sur la réponse des communautés microbiennes aquatiques à un stress métallique.

2. Objectifs de la thèse

Dans ce contexte, l'objectif général de cette thèse était de contribuer à une meilleure compréhension de l'influence de la température sur la réponse de biofilms microbiens à une pollution métallique, en prenant le cuivre (Cu) comme contaminant modèle. Pour cela, nous avons choisi de nous appuyer exclusivement sur des approches expérimentales, basées sur l'utilisation de microcosmes de laboratoire, pour contrôler au mieux les niveaux thermiques testés et les caractéristiques physico-chimiques du milieu. De plus, et afin d'intégrer une dimension écologique à nos travaux, nous avons choisi comme modèle d'étude des biofilms naturels de rivière. Ceux-ci ont été prélevés sur le site amont (servant de référence non contaminée) de la rivière Morcille, localisée au cœur de la zone viticole du Nord Beaujolais,

et qui fait l'objet, depuis plus de 20 ans, de suivis chimiques et biologiques réguliers (Rabiet *et al.* 2008 ; Dorigo *et al.* 2010 ; Pesce *et al.* 2010 ; Foulquier *et al.* 2014).

Le premier objectif de la thèse était d'appréhender l'influence d'une hausse thermique sur la réponse de ces biofilms naturels à une exposition chronique au Cu (i.e. plusieurs semaines) représentative d'une contamination « réaliste » (i.e. $\sim 15\mu\text{g/L}$, concentration proche de celles observées dans les zones les plus contaminées de la Morcille). Pour ce faire, nous avons choisi d'évaluer, dans un premier temps, la réponse structurale et fonctionnelle des communautés microbiennes phototrophes, en soumettant les biofilms à différents niveaux d'augmentation thermique (i.e. échauffement de $+5^{\circ}\text{C}$, $+10$ et $+15^{\circ}\text{C}$), en présence ou non de Cu.

Les résultats de cette première expérience ont montré que l'augmentation de la température engendrait de fortes modifications de la structure des communautés phototrophes ainsi qu'une diminution de la bioaccumulation du Cu, le tout conduisant à une atténuation des effets toxiques observés au niveau fonctionnel. Suite à ces premiers résultats, deux hypothèses principales ont été proposées :

1. La température influence les effets du Cu, en modifiant **la sensibilité des communautés du biofilm au Cu** ;
2. La température influence les effets du Cu, en modifiant **l'exposition des communautés du biofilm au Cu** (i.e. modification des concentrations en Cu, mesurées dans les différentes fractions du biofilm).

Pour tester la première hypothèse, nous avons choisi d'appréhender finement le lien entre les modifications potentielles de la composition des assemblages de diatomées, qui représentent la composante dominante au sein du compartiment phototrophe des biofilms étudiés, et le niveau de sensibilité global des communautés phototrophes au Cu. Deux questions ont ainsi été abordées :

- La température influence-t-elle la sensibilité au Cu de communautés phototrophes qui n'ont pas été exposées à ce toxique ?
 - ➔ i.e. modifie-t-elle leur vulnérabilité en impactant leur capacité à tolérer une exposition au Cu, en cas de contamination ultérieure ?
- La température influence-t-elle la sensibilité au Cu de communautés phototrophes exposées chroniquement à ce toxique ?

→i.e. modifie-t-elle leur capacité d'adaptation en terme d'acquisition de tolérance au Cu, dans le cadre du concept « PICT » (Pollution-Induced Community Tolerance) ?

Ces investigations se sont appuyées sur des développements méthodologiques réalisés dans le cadre de cette thèse, afin d'améliorer les protocoles utilisés pour la mesure des niveaux de tolérance des communautés phototrophes, en tenant compte notamment des contraintes thermiques, qui découlent de ce type d'approche multistress.

La question de l'influence de la température sur les niveaux de sensibilité des communautés microbiennes périphytiques au Cu a également été abordée en fin de thèse au niveau du compartiment hétérotrophe. Cela a permis d'appréhender, de façon préliminaire, si l'influence de la température sur les niveaux de sensibilité au Cu s'exerçait de manière comparable sur les communautés phototrophes et hétérotrophes.

Pour tester la seconde hypothèse, il nous est apparu nécessaire de mieux caractériser la bioaccumulation du Cu, en fonction du contexte thermique, en mesurant les concentrations en Cu dans les différentes fractions du biofilm. Pour cela, des développements méthodologiques, qui concernaient la mesure des concentrations en Cu dans la matrice EPS (Substances Polymériques Extracellulaires) du biofilm, ont également été mis en œuvre au cours de cette thèse.

Afin de prendre en compte l'importance de la saisonnalité dans la réponse des communautés microbiennes naturelles aux stress environnementaux testés, les différentes expérimentations ont été réalisées à partir de biofilms prélevés à différentes saisons (hiver puis été) dans la Morcille.

3. Présentation du manuscrit

Ce manuscrit s'organise autour de 7 chapitres :

Le **Chapitre I** constitue un état de l'art de notre sujet d'étude. Il présente les caractéristiques structurales et fonctionnelles des biofilms microbiens, ainsi que leur rôle dans les cours d'eau. Il décrit aussi le comportement et le devenir du Cu, en terme de biodisponibilité vis-à-vis du biofilm, selon les modifications physico-chimiques du milieu. Les effets du Cu sur le modèle biologique étudié et les réponses associées de celui-ci sont

discutés. Et enfin, l'influence des conditions abiotiques, et plus particulièrement celle de la température, sur les effets du Cu sur les microorganismes aquatiques, sont rapportées dans ce premier chapitre.

Le **Chapitre II** décrit le matériel et les méthodes utilisés pour répondre aux différents objectifs de la thèse. Les systèmes expérimentaux et la stratégie expérimentale générale sont présentés. Puis, les méthodes de caractérisation physico-chimique du milieu d'exposition et des biofilms, et les méthodes de caractérisation de la réponse du biofilm sont détaillées. Enfin, les méthodes de traitement statistiques des données sont synthétisées.

Les premiers résultats sont détaillés et discutés dans le **Chapitre III**, qui correspond à l'étude qui visait à évaluer les interactions possibles entre la température et le Cu, en étudiant la réponse de communautés phototrophes hivernales à ces deux stress combinés. Ce chapitre a fait l'objet d'un article, soumis dans la revue *Environmental Pollution*, intitulé « Temperature modulates phototrophic periphyton response to chronic copper exposure » (**article 1**). Cette étude ayant soulevé la nécessité de réaliser des développements méthodologiques, les deux chapitres suivants sont consacrés à la description de ceux-ci.

Ainsi, le **Chapitre IV** est dédié aux développements méthodologiques qui visaient à optimiser les protocoles de test de toxicité aiguë, utilisé dans le cadre de l'approche PICT ; ceci dans le but de mieux évaluer la sensibilité des communautés phototrophes au Cu, en fonction du contexte thermique. Ce chapitre a fait l'objet de deux articles, l'un publié dans la revue *Environmental Sciences and Pollution Research*, qui s'intitule « Improved short-term toxicity test protocol to assess metal tolerance in phototrophic periphyton: Toward standardization of PICT approaches » (**article 2**), et l'autre qui sera soumis prochainement dans la revue *Aquatic Toxicology*, intitulé « Influence of temperature on pollution induced community tolerance approaches used to assess effects of copper on phototrophic periphyton » (**article 3**).

Le **Chapitre V** est dédié aux développements méthodologiques qui visaient à améliorer l'évaluation de l'exposition des communautés du biofilm au Cu, en étudiant plus particulièrement le rôle de la matrice EPS dans la bioaccumulation du Cu. Ceci avait pour but de mieux évaluer l'influence de la température sur les capacités de la matrice EPS à séquestrer le Cu et donc à protéger le biofilm de l'internalisation du Cu.

L'ensemble de ces développements méthodologiques ont ensuite été appliqués dans l'étude du **Chapitre VI**. Cette étude visait à évaluer l'influence de la température sur la sensibilité de communautés microbiennes périphytiques au Cu, en fonction de leur historique d'exposition à ce toxique. Dans le même temps, ce chapitre a pour objectif secondaire de

comparer la réponse des communautés phototrophes et hétérotrophes du biofilm. Ce chapitre a fait l'objet d'un article en préparation, intitulé « A PICT approach to assess the influence of temperature on the response of phototrophic and heterotrophic periphytic communities to a chronic copper exposure » (**article 4**).

Le **Chapitre VII** discute de l'ensemble des résultats obtenus, et donne des perspectives à notre sujet d'étude.

Les deux dernières parties de ce manuscrit correspondent aux références bibliographiques et aux annexes qui détaillent spécifiquement les protocoles utilisés afin d'évaluer (1) les concentrations en Cu labile et (2) l'expression de gènes de résistance aux stress étudiés. Les annexes regroupent également les articles auxquels j'ai contribué en marge de ce travail de thèse : (3) « Structural and functional recovery of microbial biofilms after a decrease in copper exposure: Influence of the presence of pristine communities. » (Lambert *et al.* 2012; *Aquatic toxicology*) ; (4) « Diatom immigration drives biofilm recovery after chronic copper exposure. » (Morin *et al.* 2012b ; *Freshwater Biology*) ; (5) « The effect of temperature and a herbicide mixture on freshwater periphytic algae. » (Larras *et al.* 2013; *Ecotoxicology and Environmental Safety*).

Chapitre I

État des connaissances

1. Le biofilm, une structure microbienne dynamique et un acteur écologique majeur du fonctionnement des cours d'eau

« Pourquoi glisse-t-on sur les cailloux lorsque l'on marche au bord d'une rivière ?
Pourquoi les coques des bateaux sont-elles recouvertes d'un tapis visqueux brunâtre ou verdâtre ?
On dit souvent que ce sont des « algues » qui poussent sur ces surfaces immergées.
Ce n'est pas faux, mais pas tout à fait exact non plus. »

Briandet et al. Biofilms, quand les microbes s'organisent. Editions Quae. 2012

1.1. Définition, formation, structure et fonctionnement du biofilm

1.1.1. Historique et définition

On attribue la découverte des biofilms à l'inventeur du microscope, Antoni Van Leeuwenhoek, qui observa en 1683, des communautés de micro-organismes à la surface de ses dents. Cependant, le terme de biofilm a été utilisé 260 ans plus tard, en 1943, par Zobell, qui remarqua en milieu marin, que les bactéries fixées à un substrat étaient beaucoup plus nombreuses que les bactéries présentes à l'état libre dans la colonne d'eau (état planctonique). À cette époque, l'existence des biofilms était connue tant dans des écosystèmes naturels que dans des systèmes dédiés à l'épuration des effluents, mais les outils d'investigation alors disponibles ne permettaient pas de réellement les étudier *in situ*. Ce n'est que dans les années 1990, grâce à la microscopie confocale à balayage laser, que fut observé pour la première fois, *in situ*, le biofilm avec ses différentes couches. Ainsi, cette technique d'observation, non destructrice, a permis de comprendre la formation et le fonctionnement des biofilms. De cette manière, Characklis et Marschall (Characklis *et al.* 1990) furent les premiers à définir le terme *biofilm* comme « une communauté microbienne adhérente à une surface et incluse dans une matrice de polymères exocellulaires ». **Ce terme, largement accepté aujourd'hui par les microbiologistes, décrit ainsi un ensemble de microorganismes, soit de la même espèce, soit d'espèces différentes, qui vivent en symbiose et forment une communauté. Il est constitué d'un ensemble de cellules isolées et de microcolonies de cellules filles, associées entre elles et/ou aux surfaces. Cet ensemble est contenu dans une matrice d'exopolymères (EPS) (Branger, 2012).**

Le terme *périphyton*, quant à lui, désigne, en limnologie classique, la communauté microflorale associée aux surfaces de solides immergés dans l'eau (Wetzel, 1983). Cependant, cette définition n'inclut pas les champignons, les bactéries, les protozoaires, et toutes les composantes animales. Au contraire, le terme Allemand 'Aufwuchs' prend en compte l'ensemble des microorganismes sans distinction, et rejoint ainsi en ce sens la première

définition du terme *périphyton*, donnée par Cooke en 1956, qui regroupe « les organismes (animaux et végétaux) attachés ou accrochés aux tiges, feuilles ou plantes enracinées dans l'eau, ou aux autres surfaces présentes au-dessus du fond de la rivière ». Ainsi, aujourd'hui, le terme *périphyton* rejoint le terme *biofilm* et décrit un ensemble complexe de microorganismes autotrophes, telles que les algues et les cyanobactéries, et hétérotrophes, comme les bactéries, les champignons, ou encore les protozoaires (Azim *et al.* 2005). On peut toutefois noter que le terme *périphyton* renvoi à un ensemble de microorganismes lié à un substrat immergé, plus ou moins exposé à la lumière, selon les caractéristiques du milieu aquatique. Concernant le terme *biofilm*, celui-ci fait référence à un ensemble de microorganismes lié à un substrat, non restreint au milieu aquatique. Par conséquent, le biofilm peut évoluer dans un milieu exempt de lumière, contrairement au périphyton. Selon le substrat d'origine, différents termes plus spécifiques sont employés pour caractériser le périphyton, tels que *épilithon* (surfaces minérales), *épiphyton* (macrophytes) ou *épipélon* (surface des sédiments) (Ramade, 1998). Ainsi, les deux termes *biofilm* et *périphyton* seront considérés sans distinction dans ce manuscrit.

1.1.2. Formation et structure du biofilm

La formation du biofilm est un processus complexe, qui fait intervenir différentes étapes, telles que l'adhésion, la croissance *via* la formation de microcolonies, la maturation et le détachement cellulaire (Fig I.1.).

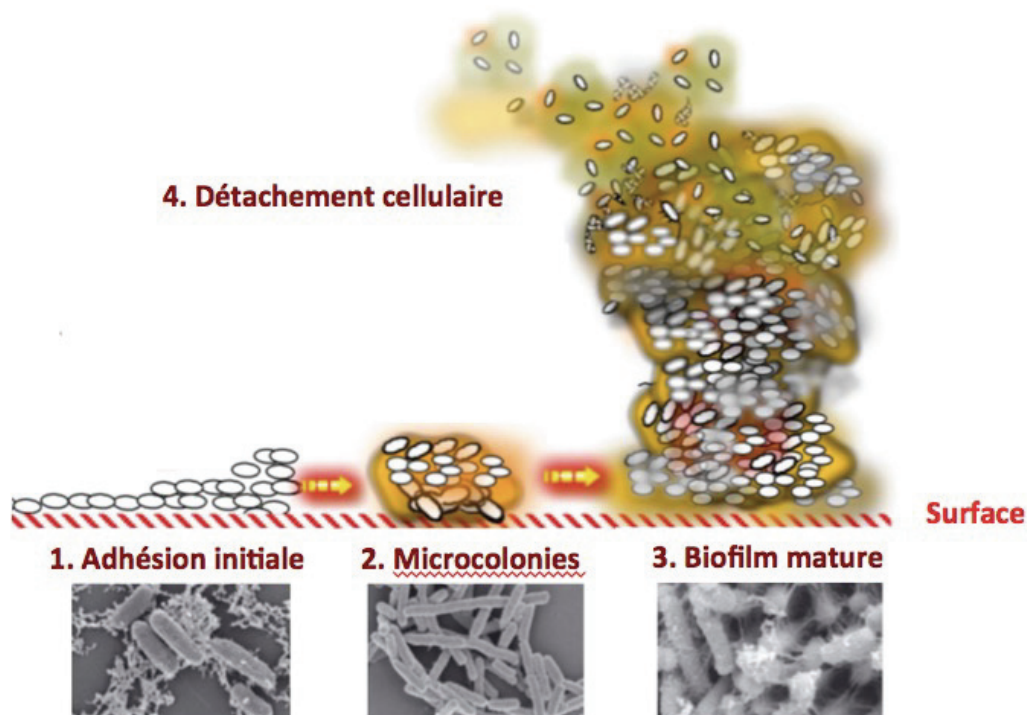


Figure I.1. Les 4 grandes étapes de la formation du biofilm. (d'après Rendueles and Ghigo, 2012). Les images de microscopie électronique à balayage illustrent les différentes étapes de formation d'un biofilm, dans sa composante bactérienne.

Dans un premier temps, les bactéries planctoniques, qui évoluent librement dans un milieu liquide, adh rent à une surface abiotique ou biotique (adhésion réversible). La fixation des cellules bactériennes à la surface est suivie par celle des cellules algales, puis des autres microorganismes benthiques (i.e. champignons et protozoaires) (Lyautey *et al.* 2005). Cependant, d'après Stevenson (1983), la colonisation du support par le biofilm épilithique pourrait également être initiée par les diatomées, qui pourraient modifier leur microenvironnement et favoriser ainsi la colonisation des autres algues (i.e cyanobactéries et chlorophycea). En outre, certaines conditions environnementales peuvent favoriser en premier lieu la colonisation des chlorophycée (forte intensité lumineuse) ou des bactéries hétérotrophes (faible intensité lumineuse) (Roeselers *et al.* 2007). L'attachement des cellules microbiennes dépend des propriétés de la surface considérée (i.e. rugosité, hydrophobicité et polarité), mais aussi des caractéristiques physico-chimiques du milieu aqueux, tels que le pH, la disponibilité en nutriments, la force ionique ou encore la température (Donlan, 2002). De plus, cette première étape est fortement conditionnée par les caractéristiques des cellules microbiennes elles-mêmes, comme l'hydrophobicité de surface, la présence d'appendices cellulaires (i.e.

pili, fimbriae et flagelle), et la production d'EPS (Donlan, 2002). Le 'quorum-sensing', système de communication bactérien, qui coordonne la régulation d'un certain nombre de gènes, joue également un rôle important dans l'attachement (et le détachement) cellulaire (Bassler and Losick, 2006).

Après cette étape d'adhésion initiale, le développement en trois dimensions du biofilm a lieu, avec la formation de microcolonies, qui prennent la forme d'agrégats, composés à la fois des microorganismes présents initialement qui se divisent et de microorganismes qui s'attachent sur le biofilm en croissance (Roux and Ghigo, 2006).

L'étape suivante de maturation du biofilm mène généralement à des changements de la structure tri-dimensionnelle des agrégats formés précédemment (Neu and Lawrence, 1997 ; Watnick and Kolter, 2000). Les microcolonies se développent en piliers d'épaisseur variable et les cellules sont englobées dans la matrice EPS. Les espaces qui séparent les microcolonies forment des « canaux » qui assurent la circulation de fluides et permettent à la fois l'apport de nutriments aux microorganismes et l'élimination de leurs produits de dégradation (Lawrence *et al.* 1991). Cette étape de maturation dépend de la production de la matrice EPS, qui assure la cohésion et la structure tri-dimensionnelle du biofilm mature. Ce sont les protéines dites « non enzymatiques » (i.e. les protéines associées à la surface cellulaire et les protéines extracellulaires liées aux carbohydrates, appelées lectines), présentes au sein de la matrice EPS, qui assurent la formation et la stabilisation de celle-ci. L'abréviation EPS désignait, à l'origine, les « substances polysaccharides extracellulaires », car seuls les polysaccharides avaient été identifiés, dans un premier temps. Cette abréviation a été conservée, même si le terme EPS regroupe aujourd'hui les différentes composantes de la matrice, à savoir : polysaccharides, protéines, acides nucléiques, acides uroniques, lipides, carbohydrates, substances humiques et substances inorganiques (Allison *et al.* 1998 ; Wingeder *et al.* 1998). Les carbohydrates et les protéines constituent les substances majoritaires de la matrice EPS (Frolund *et al.* 1996 ; Dignac *et al.* 1998 ; D'Abzac *et al.* 2009, 2010). La structure de la matrice EPS peut être découpée en deux couches : la couche interne, correspondant aux EPS fortement liés aux cellules microbiennes (TB-EPS, tightly bound EPS) et la couche externe, correspondant aux EPS faiblement liés aux cellules microbiennes (LB-EPS, loosely bound EPS) (Nielsen and Jahn, 1999). Dans la majorité des biofilms, cette matrice représente environ 90% du poids sec. Elle assure l'immobilisation et la proximité des cellules microbiennes, favorisant ainsi les interactions entre microorganismes (Romani *et al.* 2008; Flemming and Wingender, 2010). De plus, elle joue un rôle en tant que source de nutriments et de matière organique (MO).

La forte diversité microbienne du biofilm, et la multitude des processus biologiques et physico-chimiques qui s'y déroulent, induisent une grande complexité structurale. La structure du biofilm peut être influencée par (i) les paramètres abiotiques, tels que la température de l'eau (DeNicolas, 1996), la disponibilité en nutriments (Bothwell, 1993 ; Della *et al.* 2007), le type de support (Murdock and Dodds, 2007), la lumière (Wetzel, 1983 ; Boston and Hill, 1991 ; Hill 1996) et les polluants (Lawrence *et al.* 2005 ; Tornes *et al.* 2007 ; Morin *et al.* 2008 ; Tlili *et al.* 2008) ; et (ii) par les paramètres biotiques, telles que la prédation et la compétition (Bourassa and Cattaneo, 1998 ; Jackson *et al.* 2001) (Fig I.2.).

Au cours de la dernière étape, qui consiste en un détachement (ou une dispersion) cellulaire, un certain nombre de cellules retournent à l'état planctonique et vont coloniser de nouvelles surfaces (Rendueles and Ghigo, 2012). Cette dispersion a lieu en réponse aux changements environnementaux, comme un manque de ressource en nutriments par exemple. Le détachement cellulaire nécessite la modification de la matrice, initiée en partie par des enzymes extracellulaires.

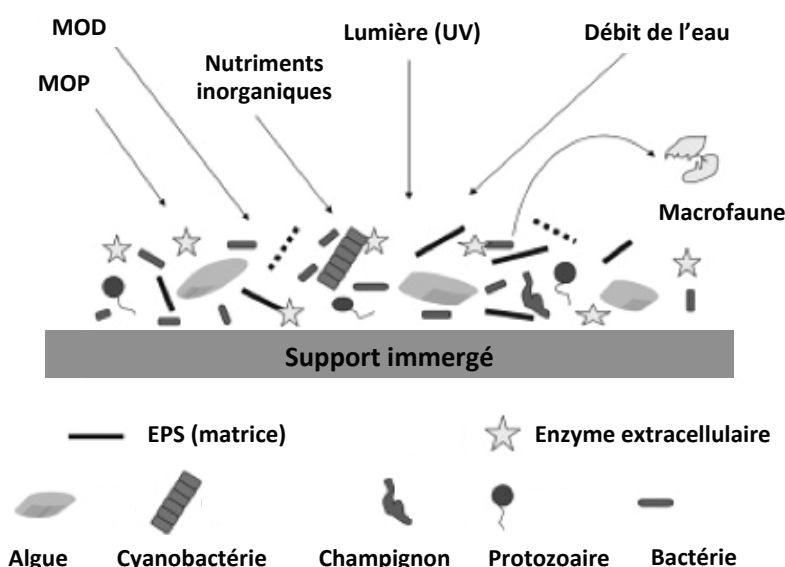


Figure I.2. Structure théorique d'un biofilm de rivière (d'après Pusch *et al.* 1998). Les principaux constituants du biofilm et paramètres environnementaux, qui affectent la structure et la fonction de celui-ci, sont représentés. EPS, substances polymériques extracellulaires ; MOD, matière organique dissoute ; MOP, matière organique particulaire.

1.2. Fonctions du biofilm microbien dans les cours d'eau

Parmi les biocénoses, les biofilms sont des acteurs clés dans le fonctionnement général des écosystèmes aquatiques, en particulier en milieu lotique. Ainsi, les micro-algues et les cyanobactéries, qui constituent le compartiment phototrophe du biofilm, produisent une grande part de la MO (production primaire du carbone organique par photosynthèse) dont se

nourrissent les organismes brouteurs (gastéropodes ou certains poissons) ; alors que les bactéries et les champignons, qui constituent la majorité du compartiment hétérotrophe, dégradent la matière organique autochtone (issue du milieu, essentiellement produite par le compartiment phototrophe) et allochtone (issue du milieu extérieur, par lessivage des sols, rejets domestiques, industriels ou agricoles) et recyclent les nutriments (production secondaire). Les biofilms participent donc activement aux cycles biogéochimiques (et notamment ceux du carbone, de l'azote et du phosphore) et contribuent à l'auto-épuration des cours d'eau (Oraison *et al.* 2011). Ils représentent une forme de vie microbienne très favorable aux synergies entre microorganismes phototrophes et hétérotrophes, puisque les microorganismes hétérotrophes utilisent directement la MO issue de la photosynthèse algale et, en retour, les microorganismes phototrophes profitent des nutriments issus de ces processus de minéralisation, et qui sont indispensables à leur développement (CO_2 , PO_4^{3-} , NH_4^+ , SO_4^{2-})(Chrost, 1992 ; Zheng *et al.* 2002).

Le compartiment phototrophe effectue la photosynthèse, qui permet la fixation et la réduction du dioxyde de carbone (CO_2), du carbone organique, ainsi que la libération du dioxygène (O_2). Chez les eucaryotes, l'ensemble des réactions de la photosynthèse a lieu dans la membrane des thylakoïdes des chloroplastes. Les micro-algues et les cyanobactéries effectuent une photosynthèse oxygénique, qui nécessite la coopération de deux complexes protéiques: le photosystème I (PS I) et le photosystème II (PS II) (Nield, 1997 ; Nield, 2003). L'énergie lumineuse est tout d'abord absorbée par l'antenne collectrice (complexes pigments – protéines : LHC, light harvesting complex) du PS II, qui transmet ensuite son énergie à un dimère de chlorophylle a (chl *a*), contenue dans le centre actif du PS II, constitué deux sous unités protéiques D1 et D2 (Jupin and Lamant, 1997). Les électrons libérés ensuite sont captés par l'accepteur primaire et transportés par la chaîne d'accepteurs d'électrons. Le PS I intervient dans un second temps, afin de jouer le rôle d'accepteur d'électrons. (Jupin and Lamant, 1997). L'énergie lumineuse, captée par les chl *a* des antennes collectrices du PS II, est dissipée selon trois voies : la photochimie (P), l'émission de chaleur ou dissipation thermique (D) et l'émission de fluorescence (F). Les mesures de fluorescence de la chl *a* renseignent sur l'efficacité de la réaction photosynthétique (Jupin and Lammart, 1997 ; Hancke *et al.* 2008) et donc sur l'état physiologique de l'organisme photosynthétique.

Le compartiment hétérotrophe joue un rôle majeur dans la transformation de la MO (Sabater *et al.* 2002) et permettent ainsi son transfert vers les niveaux trophiques supérieurs (Sanders *et al.* 1989). Dans les milieux aquatiques, les composés de haut poids moléculaire

sont les principaux composants de la MO (Amont *et al.* 1994, 1996). Or, ces composés ne peuvent pas être assimilés directement par les bactéries. Afin de permettre l'assimilation, et donc le transport de la MO à travers la membrane bactérienne, les substrats complexes, de haut poids moléculaire, doivent dans un premier temps être hydrolysés à l'extérieur de la cellule, en molécules de plus faible poids moléculaire (Chrost *et al.* 1990 ; Weiss *et al.* 1991). Ce processus est réalisé par les enzymes extracellulaires. On nomme exo-enzymes, les enzymes excrétées à l'extérieur de la cellule et libres dans la colonne d'eau (Hoppe, 1983) et ecto-enzymes, les enzymes excrétées à l'extérieur de la cellule et liées à la membrane cellulaire (Chrost *et al.* 1991). Dans les rivières, les activités enzymatiques extracellulaires sont assurées principalement par les ecto-enzymes (Karrasch *et al.* 2003). La β -glucosidase (β -Glu) et la leucine aminopeptidase (Lap) sont les ecto-enzymes liées aux activités bactériennes, principalement retrouvées dans les milieux aquatiques. Elles interviennent, respectivement, dans le cycle du carbone et de l'azote et sont responsables de la dégradation des polymères naturels, tels que les carbohydrates (i.e. glucides) et les protéines (Chrost *et al.* 1992). La β -Glu hydrolyse les liaisons β dissacharides du glucose, de la cellulose et de la carboxyméthylcellulose (Barman *et al.* 1969). La Lap hydrolyse un nombre considérable de peptides et d'amides, ayant une configuration L, avec une affinité particulière pour les L-leucyl-peptides et les L-leucyl-amides (Chrost *et al.* 1991). La phosphatase est aussi retrouvée dans les milieux aquatiques. Elle peut être d'origine bactérienne ou algale (Vidal *et al.* 2003). Elle intervient dans le cycle du phosphore et est responsable de la dégradation des monoesters orthophosphoriques, permettant ainsi la production du phosphore inorganique (Klotz, 1992). L'induction de la production des enzymes extracellulaires dépend de la concentration en substrat dans le milieu. En effet, la MO agit comme un activateur ou un répresseur de leur synthèse : elle est réprimée lorsque les concentrations présentes dans la cellule sont proches de celles du milieu environnant. Inversement, elle est induite lorsque la concentration des composés de faible poids moléculaire directement assimilables atteint une valeur critique à l'intérieur de la cellule bactérienne, ou dans son environnement proche (Chrost, 1991).

Une fois les enzymes excrétées, l'activité enzymatique est gouvernée par la qualité (composés assimilables ou non) et la quantité de MO (Sinsabaugh *et al.* 1997), mais aussi par les paramètres environnementaux tels que le pH, la luminosité et la température (Nausch *et al.* 1998 ; Stevenson, 1996 ; Espeland and Wetzel, 2001). La température influence la vitesse des réactions enzymatiques (Chappell and Goulder, 1994), mais aussi la structure de l'enzyme considérée et la stabilité du complexe enzyme-substrat. Ainsi, Nausch *et al.* (1998) ont montré que l'activité de la β -Glu en milieu marin était réduite avec la diminution de la température.

Compte tenu de son rôle dans la dégradation de la matière organique (minéralisation), et les cycles biogéochimiques, le biofilm contribue activement à l'autoépuration des cours d'eau, ce processus permettant aux cours d'eau d'éliminer, en outre, les nutriments déversés dans le milieu par les bassins versants agricoles. Outre leur apport en nutriments, les activités agricoles mènent aussi à une pollution chimique des cours d'eau, de par l'utilisation de pesticides organiques (organochlorés, organophosphorés et carbamates) et inorganiques (métaux).

2. Le cuivre, usage agricole, devenir dans l'environnement et impacts sur le biofilm

« Peut-être avez-vous déjà été étonné de l'étrange couleur bleu turquoise qu'arborent certains murs contre lesquels on a cultivé de la vigne ? Ce bleu, c'est celui du sulfate de cuivre. »

*Bouillie bordelaise : gare à la toxicité du cuivre pour les écosystèmes,
Clémentine Desfemmes, 2014*

2.1. De l'utilisation du cuivre en agriculture à la contamination des cours d'eau

Les petits cours d'eau de bassins versants agricoles sont exposés aux polluants métalliques, en particulier le Cu, du fait de sa large utilisation comme fongicide, notamment dans le cadre de la viticulture. Les fongicides composés de Cu sont les seuls à présenter une réelle efficacité contre *Plasmopora viticola*, agent responsable du mildiou de la vigne, l'une des maladies les plus sévères des vignobles français. Le mildiou est apparu en 1878 en Gironde. En provenance d'Amérique, ce champignon parasite s'est ensuite développé rapidement, favorisé par l'humidité du climat. Il s'est attaqué d'abord aux feuilles des vignes, puis aux grappes, qui ont fini par se dessécher ou pourrir sur pied. Alexis Millardet, un botaniste, avait remarqué que dans le Médoc (Vignoble de Bordeaux), les vigneronns de Saint-Julien avaient l'habitude de pulvériser du vert-de-gris (à base de Cu) sur leurs vignes qui longeaient les chemins. Ils voulaient ainsi dissuader les voleurs de chaparder leurs raisins et dans le même temps, que leurs vignes, couvertes de traces de Cu, soient épargnées par le champignon. Il lui fallut ensuite trouver les proportions efficaces d'un mélange à base de sulfate de Cu neutralisé par un lait de chaux, dont le chimiste Ulysse Gayon mit au point la formule exacte en 1880. Ce traitement fut baptisé *bouillie bordelaise*. Il a été rapidement utilisé à grande échelle et est encore utilisé aujourd'hui aux côtés d'autres fongicides. Le constat est simple : aucune alternative ne permet actuellement un abandon de ce produit (Fournier, 2009).

Les composés de Cu sont les seules substances actives autorisées au cahier des charges européen régissant l'agriculture biologique (règlement CE 899/2008, texte d'application du règlement CE 834/2007). Cependant, il existe des risques écotoxicologiques liés à l'utilisation intensive du Cu, comme le montre l'évaluation réalisée dans le cadre de la directive 2009/37/CE du 23 avril 2009 (ITAB, 2009). Dans le milieu aquatique, la concentration en Cu, sans effet prévisible pour l'environnement (PNEC ; predicted no-effect concentration) est fixée à $7,8 \mu\text{g L}^{-1}$ au niveau européen (Van Sprang *et al.* 2007), et à une valeur nettement plus faible en France de $1,6 \mu\text{g L}^{-1}$.

Suite à l'épandage de produits phytosanitaires composés de Cu à la surface du bassin versant, ce métal rejoint les milieux aquatiques par ruissellement, lixiviation ou lessivage des sols (Barriuso, 2004 ; Calvet, 2005). Dans le milieu aquatique, le Cu est en équilibre entre la phase dissoute et la phase particulaire ; la limite entre ces deux phases étant arbitrairement fixée à un seuil de filtration de $0,45 \mu\text{m}$. Ainsi, la toxicité de ce métal sera conditionnée suivant sa forme dans le milieu, (i.e. forme libre ou complexée à la MO) (voir § 1.2).

Les concentrations en Cu dissous sont généralement comprises entre $0,3$ et $3 \mu\text{g L}^{-1}$, dans les milieux aquatiques continentaux non soumis à une pression anthropique, (Florence, 1977 ; Nriagu, 1979 ; Carpentier *et al.* 1991), alors que les concentrations en Cu peuvent atteindre voire dépasser $15 \mu\text{g L}^{-1}$ dans des rivières situées en région agricole (Xue *et al.* 2000), en particulier lorsqu'elles sont au cœur de régions viticoles telles que le Beaujolais (Montuelle *et al.* 2010). Le transfert de fortes quantités de Cu vers les milieux aquatiques constitue donc une menace sur la qualité de l'eau et peut fortement perturber les écosystèmes.

2.2. Spéciation et biodisponibilité du cuivre

Dans les milieux aquatiques, le Cu est présent sous différentes formes tels que (Florence and Batley, 1980 ; Campbell *et al.* 2006) :

- L'ion métallique hydraté : $\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$
- Les complexes inorganiques : CuCl^+ , CuOH^+ , $\text{Cu}(\text{OH})_2$, CuSO_4 , CuCO_3 , CuHCO_3^+
- Les complexes organiques avec ligands synthétiques : Cu-EDTA^{2-}
- Les complexes organiques avec ligands naturels : Cu-alanine, Cu-citrate

Les complexes colloïdes inorganiques et organiques (acides humiques, fulviques, détritiques organiques). De plus, le Cu peut se fixer aussi aux EPS, présents sous forme d'exsudats microbiens ou de matrice, et former ainsi d'autres types de complexes organiques (Morel and Price, 2003).

Dans les milieux aquatiques (eaux continentales et marines), la majorité du Cu est sous forme complexée (97 à 99%) et on le retrouve principalement sous forme d'hydroxyde $\text{Cu}(\text{OH})_2$ ou de carbonate CuCO_3 (Stumm and Morgan, 1996).

L'interaction entre les organismes et le métal dépend, entre autre, de la forme (ou espèce) du métal considéré. L'ensemble des différentes formes se rapporte ainsi à la spéciation métallique. Toutes ces formes ne sont pas toxiques pour les organismes, dans le sens où elles ne sont pas toutes biodisponibles. Il est donc primordial d'aborder la notion de biodisponibilité (ou disponibilité biologique). Ce terme définit la fraction d'une substance qui est immédiatement disponible pour absorption par les organismes (INERIS, 2003).

En effet, le Cu peut être (i) dissous et prendre une forme libre ou labile (ce dernier terme définissant les complexes métalliques facilement dissociables) ; ainsi, il est considéré comme biodisponible pour les organismes (Florence, 1982 ; Deaver and Rodgers, 1996) ou (ii) prendre une forme sorbée en s'associant à la MO dissoute. De cette manière, en diminuant la concentration de la forme libre dans le milieu, la complexation métallique réduit la biodisponibilité du métal.

La figure I.3. montre les différents processus clés qui déterminent la biodisponibilité d'un métal, sous sa forme dissoute, vis-à-vis d'une microalgue. Pour être rendu biodisponible, le métal, sous ses différentes formes, doit d'abord être transporté du milieu vers l'environnement proche du microorganisme (par diffusion, 1). Des phénomènes de complexation métallique peuvent avoir lieu avec la MO dissoute (MO de taille inférieure à $0,45\mu\text{m}$; MOD), la MO colloïdale (MO constituant un sous-groupe de la MOD, et de taille comprise entre 1 nm et $0,45\mu\text{m}$; MOC ; « la vraie » MOD étant considérée comme inférieure à 1nm ; Tercier-Waeber *et al.* 2012) et la MO particulaire (MO de taille supérieure à $0,45\mu\text{m}$; MOP). Ces complexes métalliques peuvent se dissocier et s'associer (2) au cours du temps, tout en se rapprochant de la surface microbienne.

Afin d'induire un effet biologique, le métal doit d'abord se lier à un récepteur de la membrane biologique (3) et ensuite être transporté à travers la membrane (internalisation, 4). Les ions majeurs, qui définissent la dureté de l'eau, tels que Ca^{2+} , et Mg^{2+} , peuvent entrer en compétition avec l'ion métallique (M^{n+}) et venir se fixer sur les récepteurs de la membrane biologique et ainsi diminuer l'assimilation du métal. Une fois à l'intérieur de la cellule, le métal va interagir avec différents constituants cellulaires et affecter les processus métaboliques cellulaires (5).

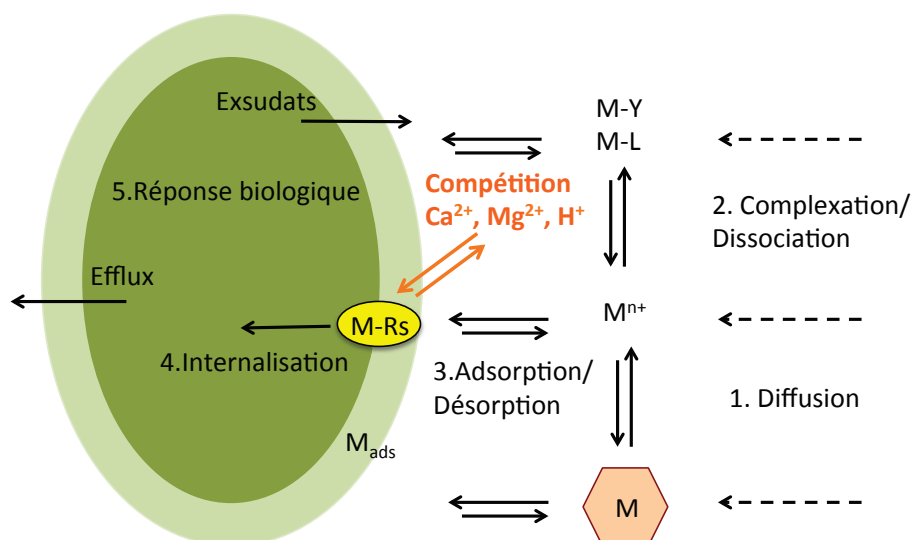


Figure I.3. Processus clés qui déterminent la biodisponibilité d'un métal à proximité d'un organisme. Exemple d'une microalgue d'eau douce. (d'après Tercier-Weaver *et al.* 2012). M^{n+} représente l'ion métallique trace ; M-L, les petits complexes mobiles et labiles ; M-Y, les complexes inertes (non labile) ou non-mobiles. M représente le métal lié à la matière organique dissoute, colloïdale et particulaire, représentée par un hexagone ; M-Rs, le métal lié aux récepteurs des membranes biologiques et M_{ads} , le métal adsorbé à la surface du microorganisme.

Les phénomènes de complexation métallique sont gouvernés, comme nous l'avons vu, par la MO, mais aussi par un ensemble de paramètres physico-chimiques, tels que le pH, la température, et la dureté. Ils modifient la spéciation des métaux, en influençant la répartition des différentes formes chimiques métalliques, mais ils agissent également sur l'assimilation de ces composés par les organismes vivants.

Le pH est un paramètre majeur qui contrôle les cycles diurnes des concentrations métalliques dissoutes, potentiellement biodisponibles, dans de nombreux cours d'eau. En effet, les processus de sorption métallique sont gouvernés principalement par les variations de pH intra-journalières, liées aux activités métaboliques des biofilms phototrophes (Nimick *et al.* 2003 ; Morris *et al.* 2005; Beck *et al.* 2009). La figure I.4. montre un exemple de la spéciation chimique du Cu, en fonction du pH (les principales espèces sont représentées). On observe une diminution de la fraction de Cu libre (Cu^{2+}) lorsque le pH augmente. Lorsque le pH est compris entre 6 et 7, le carbonate de cuivre ($CuCO_3$) devient l'espèce majoritaire. Le Cu^{2+} étant considéré comme l'espèce chimique la plus toxique, puisque biodisponible, on observe ainsi généralement une diminution de la toxicité du Cu avec l'augmentation du pH (INERIS, 2004).

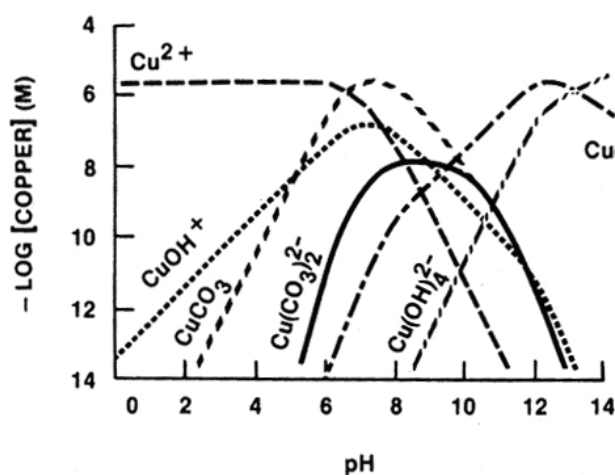


Figure I.4. Distribution des principales espèces inorganiques du Cu en fonction du pH, en milieu d'eau douce (d'après Ersnt *et al.* 1975).

Dans les milieux aquatiques, en conditions naturelles, le pH et la température varient dans le même sens (Fig I.5.). En effet, durant la journée, la température de l'eau augmente avec l'ensoleillement. Dans le même temps, l'augmentation de l'intensité lumineuse va entraîner une augmentation de l'activité photosynthétique du biofilm, menant à une augmentation du pH de l'eau. Inversement, au cours de la nuit, l'intensité lumineuse diminue, entraînant une diminution de la température de l'eau. L'intensité lumineuse étant réduite, l'activité photosynthétique du biofilm diminue, favorisant une diminution du pH de l'eau.

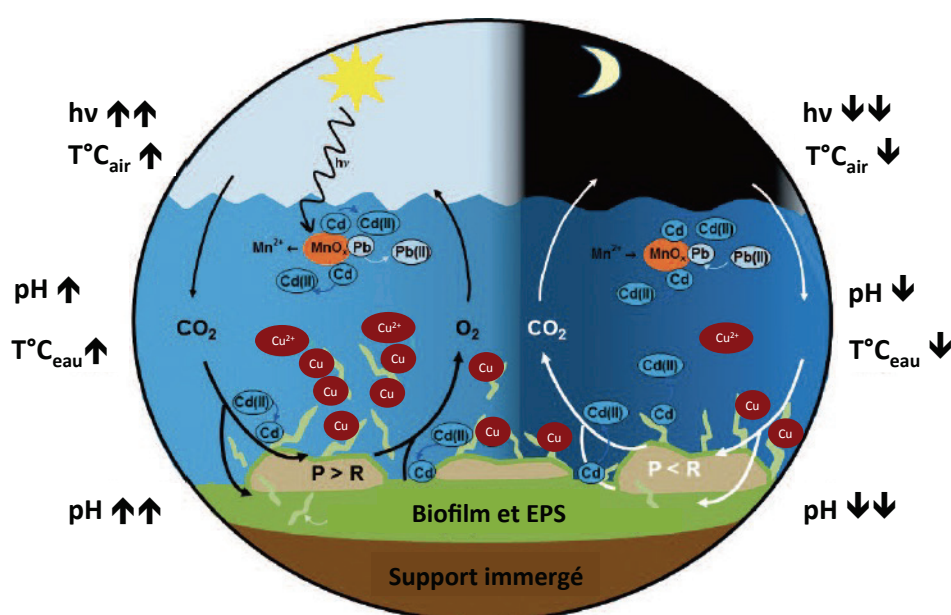


Figure I.5. Principaux processus qui contrôlent la spéciation du Cu (en rouge) du Pb (en bleu clair) et du Cd (en bleu foncé). Exemple de la rivière Riou-Mort (France) (d'après Tercier-Weaver *et al.* 2012).

De nombreuses études ont montré une corrélation négative entre les concentrations en métaux dissous et les variations de température et de pH (exemples : Brick and Moore, 1996 ; Nimick *et al.* 2003 ; Tercier-Waeber *et al.* 2009). Par exemple, Gammons *et al.* (2005) ont montré que les concentrations en Cu dissous, mesurées dans le ruisseau Fisher (Montana, États-Unis), situé dans une zone de forte activité minière, étaient corrélées négativement à la température ($r^2 = 0,95$; $p < 0,001$) et dans une moindre mesure, au pH ($r^2 = 0,62$; $p < 0,001$) (Fig I.6.). Ainsi, les concentrations en Cu dissous diminuaient au cours de la journée, atteignant au minimum $63 \mu\text{g L}^{-1}$ à 17 h et augmentaient au cours de la nuit, atteignant au maximum $151 \mu\text{g L}^{-1}$ à 5 h. Dans la plupart des cours d'eau, de larges variations diurnes de la température et du pH ont été enregistrées. Ainsi, il est difficile d'isoler les effets de ces deux facteurs sur les variations des concentrations en Cu dissous observées dans ces milieux (Jones *et al.* 2004). Cependant, dans l'étude de Gammons *et al.* (2005), si la température variait significativement au cours d'un cycle diurne ($\pm 11^\circ\text{C}$), le pH, lui, ne variait que de 0,06 U (Fig. I.6.), suggérant ainsi un effet seul de la température sur les concentrations en Cu dissous.

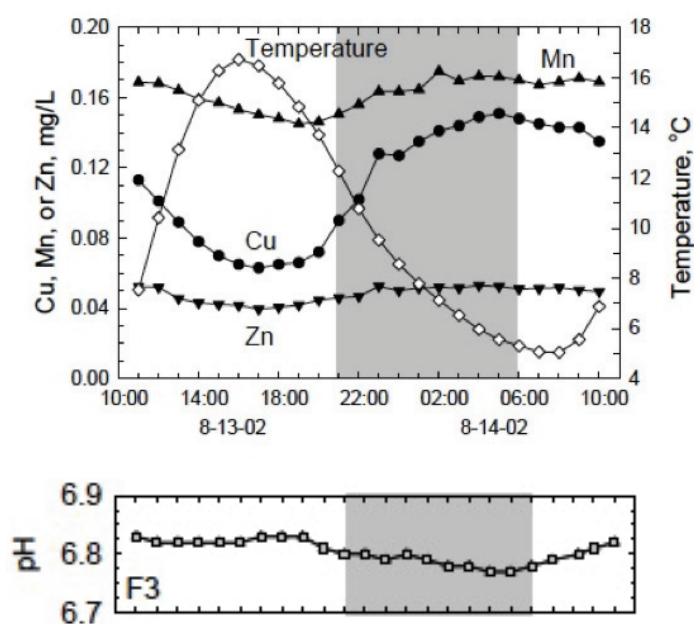


Figure I.6. Évolution des concentrations en Cu, Zn et Mn dissous mesurées dans un ruisseau de montagne (Fisher Creek, Montana, États-Unis) en fonction des variations de températures et de pH relevées sur 24h (d'après Gammons *et al.* 2005).

Concernant les effets de la dureté de l'eau sur la spéciation métallique, Stiff (1971) a montré que la forme libre du Cu était réduite de 11 à 3% par rapport au Cu dissous total, lorsque les concentrations en CaCO_3 augmentaient de 50 à 250 mg L^{-1} , à pH 7,5. L'influence de la dureté de l'eau sur la toxicité métallique est appréhendée majoritairement chez les macroorganismes, tels que les poissons ou encore les invertébrés. Il a été montré que

l'augmentation de la dureté de l'eau, caractérisée par une augmentation de la concentrations en ions tels que Ca^{2+} , Mg^{2+} et HCO_3^- , protégeait la cellule de la toxicité métallique (Folson *et al.* 1986 ; Welsh *et al.* 2000). Deux hypothèses, permettant d'expliquer la réduction de la toxicité métallique dans ce contexte, ont été proposées par Rai *et al.* (1981), et concernent la réduction du transport passif des métaux au travers de la membrane, liée (i) à la complexation avec le Cu, permettant principalement la formation de complexes CuCO_3 (Stumm and Morgan, 1996), ou (ii) à la compétition avec les ions Cu^{2+} pour la fixation aux récepteurs membranaires.

2.3. Effets et réponse du biofilm au cuivre

2.3.1 Effets chroniques du cuivre sur la structure et le fonctionnement du biofilm

La durée de la période d'exposition est définie relativement à la durée du cycle de l'organisme. Une exposition dite « chronique », qui correspond à une exposition persistante continue, ou discontinue (ADEME), encadre un ou plusieurs cycles d'un organisme biologique considéré (i.e. exposition à moyen ou long terme) (Rand and Petrocelli, 1985)¹. Une exposition chronique au Cu peut engendrer des modifications structurales sur le biofilm. En effet, on observe très souvent une diminution de la biomasse algale, qui s'accompagne d'un changement de la structure de la communauté. Par exemple, il a été montré pour des biofilms de rivière qu'une exposition de 4 semaines à une concentration en Cu dissous proche de $30 \mu\text{g L}^{-1}$ (Serra and Guasch, 2009) ou de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ (Lambert *et al.* 2012) entraînait une diminution de la biomasse et une modification de la répartition des classes algales, qui se traduisait par une augmentation de la proportion des algues vertes (chlorophycæ) au détriment des diatomées. De même, Tlili *et al.* (2010) ont observé une prolifération d'algues vertes, suite à une exposition de 3 semaines au Cu ($30 \mu\text{g L}^{-1}$), alors que d'autres études ont montré des changements de structure, favorisant les cyanobactéries au dépens des diatomées, après une exposition de 5 semaines, à une même concentration en Cu (i.e. $30 \mu\text{g L}^{-1}$) (Serra *et al.* 2009).

¹ À l'échelle de la communauté, au regard de la première (adhésion) et de la dernière (détachement) étape de la formation du biofilm, nous pouvons considérer qu'un cycle, en système expérimental fermé, correspond à 4 semaines au minimum de développement du biofilm. Concernant le milieu naturel, la formation du biofilm dépend fortement des conditions physico-chimique du milieu, il est donc plus difficile de définir une durée d'exposition chronique au regard d'un cycle.

En plus des modifications dans la répartition des classes algales, l'exposition chronique au Cu modifie aussi la diversité diatomique. Ainsi, Serra *et al.* 2009 et Morin *et al.* 2012b ont montré un changement dans la composition taxonomique des diatomées de biofilm de rivière, associé à une diminution de la richesse spécifique, suite à une exposition de 4 semaines au Cu ($20 \mu\text{g L}^{-1}$).

Concernant les communautés hétérotrophes, il a également été montré que des expositions chroniques au Cu à une concentration de $30 \mu\text{g L}^{-1}$, pendant 3 semaines (Tlili *et al.* 2010), et de $20 \mu\text{g L}^{-1}$, pendant 10 semaines (Lambert *et al.* 2012), engendraient des effets sur la structure des communautés bactériennes. Ces effets, qui se traduisent par des changements de diversité importants au sein de la communauté bactérienne, peuvent découler d'un effet direct dû à la toxicité du Cu qui peut s'exercer sur certaines espèces bactériennes, mais aussi d'un effet indirect (Massieux *et al.* 2004). En effet, cet effet indirect résulte d'une modification importante de la MO assimilable par la communauté hétérotrophe, tant d'un point de vue (i) quantitatif, avec la sénescence de certaines espèces d'algues suite à l'exposition au Cu, permettant ainsi une libération importante de MO, que (ii) qualitatif, avec la synthèse de produits algaux de composition très différente, due au changement de diversité algale. Ces effets indirects du Cu peuvent ainsi induire des changements dans la composition de la communauté bactérienne du fait d'une modification importante des ressources nutritives (Barranguet *et al.* 2003).

L'ensemble des changements concernant le compartiment hétérotrophe en réponse aux effets directs et indirects du Cu (i.e. modification de la quantité et de la qualité des ressources nutritives, élimination des espèces les plus sensibles au Cu...) peut parfois conduire à une augmentation de la densité bactérienne (Le Jeune *et al.* 2007 ; Fleeger *et al.* 2003 ; Tlili *et al.* 2010). D'après Barranguet *et al.* (2003), l'impact du Cu sur la densité bactérienne dans les biofilms peut varier selon les concentrations en Cu testées dans un contexte de prédation du biofilm (présence de vers). Dans leur travaux, une concentration élevée en Cu ($127 \mu\text{g L}^{-1}$) entraînait une augmentation de la densité bactérienne en présence de prédateurs (i.e. le ver *Ancylus fluviatilis*), contrairement à une concentration plus faible ($63,5 \mu\text{g L}^{-1}$), qui ne semblait pas influencer ce paramètre, en condition de prédation. Une sensibilité du prédateur lui-même à une forte concentration en Cu, a entraîné une diminution significative du broutage. Ainsi, l'équilibre entre densité bactérienne et broutage n'était plus maintenu, permettant l'augmentation de la densité bactérienne, malgré une forte exposition au Cu.

Parallèlement à l'impact structural, le Cu engendre un impact fonctionnel sur le biofilm, qui peut se traduire par une diminution de l'activité photosynthétique. Guasch *et al.*

(2004) ont ainsi observé une diminution par trois de l'activité photosynthétique, 24 h après le début d'une exposition au Cu de $15 \mu\text{g L}^{-1}$. Après cette diminution, une stabilisation de cette activité a été observée tout au long des 11 jours d'expérimentation restants. Lambert *et al.* (2012) ont montré un effet plus retardé du Cu sur cette activité. En effet, malgré une activité maintenue en début de suivi, l'activité photosynthétique diminuait après 8 semaines d'exposition au Cu ($20 \mu\text{g L}^{-1}$), traduisant ainsi un effet à plus long terme. L'absence d'effet du Cu sur l'activité photosynthétique de biofilms, après 6 semaines d'exposition ($30 \mu\text{g L}^{-1}$), a déjà été soulignée par Serra and Guasch (2009). D'après ces auteurs, cette absence d'effet du Cu sur ce paramètre témoigne d'une acclimatation des communautés phototrophes, qui engendre un coût important, entraînant une perte de biomasse. Navarro *et al.* (2008) suggèrent aussi que le développement d'une communauté plus tolérante à un stress (en accord avec le concept « PICT » ; voir § 1.3.2) a un « coût » en terme de réduction de la biomasse. Ainsi, il est très souvent observé, dans le cadre d'une exposition chronique, que l'activité photosynthétique est un paramètre moins sensible au Cu que la croissance algale (Cid *et al.* 1995 ; Stauber and Davies, 2000).

Concernant le compartiment hétérotrophe, les activités enzymatiques sont influencées par la présence de contaminants qui peuvent impacter la capacité d'hydrolyse des microorganismes (Lee and Tay, 1998). Ainsi, le Cu inhibe les réactions enzymatiques en se complexant avec le substrat, en se combinant avec le groupe de protéines actives des enzymes et en réagissant avec le complexe enzyme-substrat (Eivazi and Tabatabai, 1990). De cette manière, il a été montré que l'exposition chronique au Cu pouvait diminuer significativement l'activité β -Glu au sein des biofilms (Lambert *et al.* 2012). Cependant, Espeland *et al.* (2001) ont suggéré que cet effet du Cu sur l'activité β -Glu pouvait être indirect. En effet, l'exposition au Cu, entraînant la diminution de la biomasse algale, limiterait probablement dans le même temps la production de la MOD par les communautés phototrophes, source majoritaire de carbone pour les bactéries. La réponse fonctionnelle des communautés hétérotrophes au Cu dépend aussi de l'activité enzymatique considérée. Ainsi, Lambert *et al.* 2012 ont montré que l'activité de la Lap d'une communauté bactérienne de biofilm de rivière, n'était pas influencée dans un contexte d'exposition de 10 semaines à une concentration en Cu de $20 \mu\text{g L}^{-1}$, au contraire de l'activité β -Glu, qui était significativement réduite.

Bien que l'adaptation au Cu concerne très souvent à la fois les algues (ex : Soldo and Berha, 2000) et les bactéries (ex : Fechner *et al.* 2011), Barranguet *et al.* (2003) ont observé que les communautés bactériennes étaient cependant moins affectées par l'exposition au Cu que les communautés algales. Une plus forte capacité d'adaptation des bactéries à une

pollution au Cu pourrait expliquer en partie la modification observée au niveau du mode fonctionnement principal des biofilms exposés, passant ainsi d'un fonctionnement d'autotrophie vers un fonctionnement d'hétérotrophie (Barranguet *et al.* 2003 ; Arnegard *et al.* 1998 ; Blanck and Dahl, 1996).

2.3.2 Acquisition de la tolérance au cuivre

Les changements qui interviennent dans la composition des communautés microbiennes suite à une exposition chronique au Cu reflètent très souvent la sélection d'espèces plus tolérantes à ce métal. En effet, différentes études ont montré qu'une exposition chronique au Cu entraînait un remplacement des espèces sensibles par des espèces plus tolérantes (Soldo and Behra, 2000 ; Morin *et al.* 2012b). Ainsi, on s'attend à ce qu'une communauté microbienne préalablement exposée au Cu soit plus tolérante qu'une communauté microbienne qui n'a jamais été préalablement exposée à ce métal. Ces observations sont en accord avec le concept « PICT » (Pollution-Induced Community Tolerance), introduit par Blanck *et al.* en 1988. Ce concept est basé sur le postulat que l'exposition chronique d'une communauté biologique à un contaminant entraîne une sélection d'espèces plus tolérantes (sélection inter-spécifique) et/ou une adaptation spécifique, comme la mise place de mécanismes de détoxification (sélection intra-spécifique), menant à l'augmentation de la tolérance de la communauté biologique.

L'acquisition de la tolérance qui résulte de ces modifications est détectée grâce à la réalisation de tests de toxicité aiguë. Le principe du test de toxicité aiguë ou « à court terme » (*short-term toxicity test*) repose sur l'exposition d'une communauté à une gamme de concentrations croissantes en toxique, qui permet d'observer, sur des durées courtes d'exposition (de quelques heures généralement), l'inhibition d'un paramètre mesuré, tel que la photosynthèse, certaines activités enzymatiques ou encore la respiration. La comparaison des courbes doses-réponses obtenues entre une communauté de biofilm dite « de référence » (i.e. non exposée au préalable au(x) toxique(s) testé(s)) et une communauté exposée permet la détection du PICT (Fig I.7.).

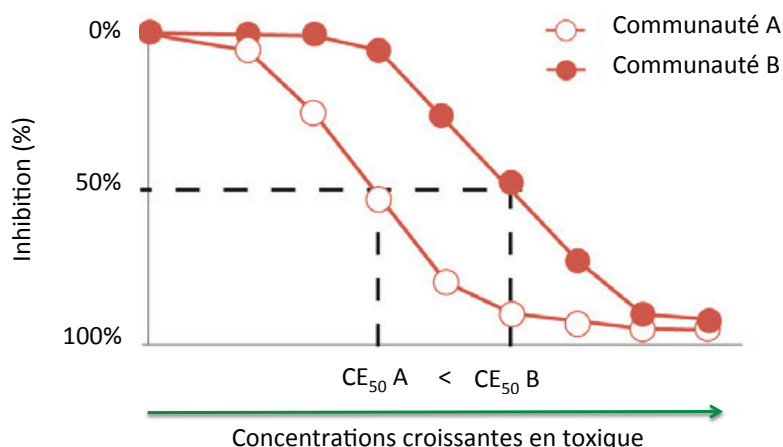


Figure I.7. *Courbes doses-réponses.* Les communautés A et B représentent respectivement une communauté de référence, non préalablement exposée au toxique et une communauté préalablement exposée au toxique.

Généralement, la tolérance est exprimée en CE_x , qui définit la concentration efficace en toxique inhibant x% du paramètre mesuré.

Ainsi, d'après Molander and Blanck (1992), le concept « PICT » est constitué de deux phases : (i) une phase de sélection au cours de laquelle la communauté est exposée chroniquement au toxique et (ii) une phase de détection, au cours de laquelle sa tolérance au toxique est évaluée au laboratoire, à partir de tests de toxicité aiguë (Fig I.8.).

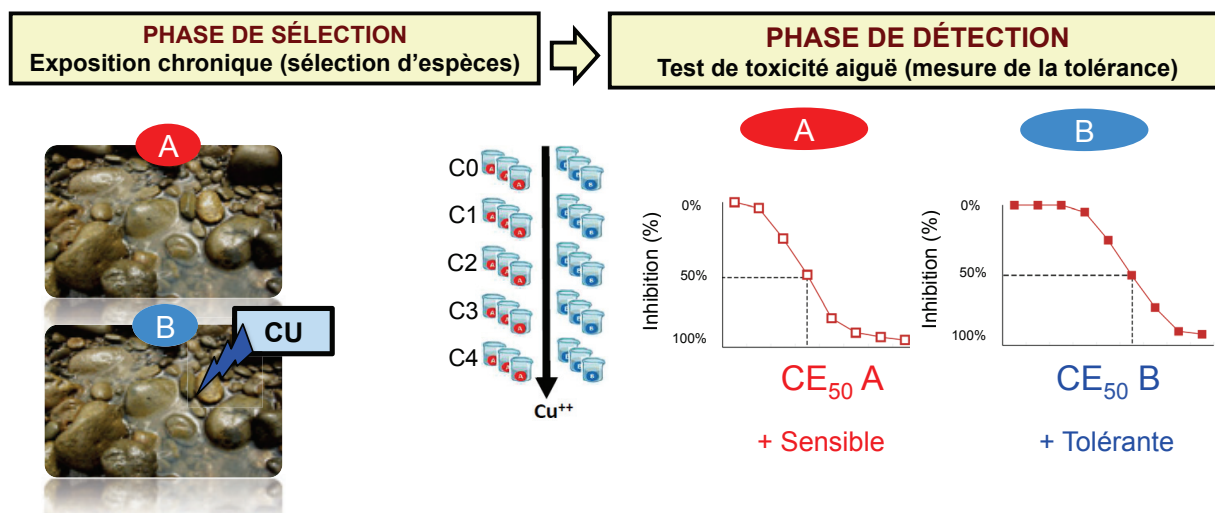


Figure I.8. *Principe du concept « PICT »*

Concernant le Cu, Soldo and Berha (2000) ont observé une augmentation de la tolérance du biofilm à ce métal après 12 semaines d'exposition (concentrations testées entre 6,4 et 318 $\mu\text{g L}^{-1}$), suite à la réalisation de tests de toxicité aiguë, basés sur la mesure de l'activité photosynthétique. De même, Foulquier *et al.* (2014) ont observé une augmentation de la tolérance des communautés phototrophes de biofilm de rivière au Cu, après 6 semaines d'exposition à ce métal, à une concentration proche de 4 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Comme pour le compartiment phototrophe, plusieurs études ont montré une acquisition de la tolérance des communautés hétérotrophes au Cu, suite à la réalisation de tests de toxicité aiguë, basés sur la mesure de l'activité enzymatique β -Glu (Fechner *et al.* 2010, 2011) et de la respiration (Dorigo *et al.* 2010 ; Tlili *et al.* 2011).

2.3.3 Effets du cuivre sur le métabolisme cellulaire algale et bactérien et mécanismes de défenses associés

Au cours de l'évolution, les organismes aquatiques (et terrestres) ont développé différentes stratégies pour établir une relation d'équilibre avec les ions métalliques présents et disponibles dans le milieu. Le but est dans un premier temps de sélectionner les métaux essentiels à la croissance microbienne (en tant que cofacteur de nombreuses enzymes et transporteur d'électrons au niveau des photosystèmes) et dans un second temps de maintenir une concentration métallique intracellulaire optimale (Pereales-Vela *et al.* 2006). En effet, une concentration en Cu trop faible perturbe le métabolisme cellulaire alors qu'une concentration trop élevée peut engendrer un effet toxique pour la cellule. En cas de fortes concentrations en Cu, les microorganismes (micro-algues, cyanobactéries et bactéries), doivent donc mettre en œuvre des mécanismes de détoxification pour neutraliser le métal (Bruins *et al.* 2000 ; Rouch *et al.* 1995) tels que :

- L'exclusion physique (barrières membranaires)
- La séquestration extracellulaire
- Les systèmes d'efflux
- La séquestration ou l'immobilisation intracellulaire

Au niveau de la membrane cellulaire, le Cu induit une peroxydation des lipides, en formant des radicaux oxygénés libres, menant ainsi à une augmentation de la perméabilité membranaire. (Mazhoudi *et al.* 1997, Cid *et al.* 1994). Ainsi, l'exclusion physique du métal

par les algues (Stokes, 1983 ; Megharaj *et al.* 2003) et les bactéries (Rouch *et al.* 1995 ; Bruins *et al.* 2000) est un des mécanismes mis en place dans ce contexte, afin de réduire la perméabilisation membranaire, protégeant ainsi, la cellule de l'internalisation du métal.

De plus, la cellule microbienne est capable de lutter contre le stress oxydant. Ce sont les groupements thiols du glutathion (tripeptide formé par la condensation d'acide glutamique, de cystéine et de glycine), qui confèrent à la cellule cette fonction anti-oxydante. Cependant, une fois rentré dans la cellule, le Cu se fixe à ce glutathion, au niveau de ses groupements thiols, et immobilise le tripeptide. De cette manière, l'exposition à des concentrations trop élevées en Cu conduit à une diminution du système de défense antioxydante. (Cid *et al.* 1994 ; Pinto *et al.* 2003 ; Morelli and Scarano, 2004 ; Sabatini *et al.* 2009).

Dans la cellule, le Cu peut inhiber certaines enzymes cytoplasmiques, telles que les estérases et la β -galactosidase (Stauber and Davies, 2000 ; Franklin *et al.* 2001 ; Adams and Stauber, 2004) et modifier le pH intracellulaire (Cid *et al.* 1994, 1995). Le Cu agit aussi sur l'appareil photosynthétique, en bloquant le centre réactionnel du PS II (Fargašová *et al.* 1999). Il peut agir à différents niveaux : sur les complexes LHC, liés aux PS II, en se liant aux groupements histidines des protéines D1 et D2, en déstabilisant les transporteurs d'électrons (les quinones Q_A et Q_B) ou encore en remplaçant les ions Mn par le Cu au niveau du centre du PS II, réduisant ainsi le dégagement d'O₂ photosynthétique (Maksymiec, 1997, Ralph and Burchett, 1998).

Afin de prévenir ces effets cellulaires potentiels, le biofilm peut mettre en place, en amont, un système de séquestration extracellulaire, qui est rendu possible par (i) la synthèse et la sécrétion dans le milieu de ligands organiques, tels que les exsudats microbiens (i.e. EPS sous forme libre) (Gonzalez-Davila *et al.* 1995 ; Croot *et al.* 2000), et (ii) le développement de la matrice EPS. La matrice EPS contient de nombreux groupes fonctionnels (ex : groupes carboxyliques, hydroxyles et phosphoriques), qui permettent la formation de complexes organométalliques (Gutnick and Bach, 2000). Ainsi, l'adsorption métallique par les EPS est l'un des plus importants mécanismes de protection des cellules microbiennes contre les substances toxiques (Liu and Fang, 2003). Différents mécanismes d'adsorption métallique sont possibles, incluant les échanges d'ions, la complexation et la précipitation de surface. Étant donné la grande diversité et la complexité de la composition de la matrice EPS, ces différents mécanismes ont lieu généralement de manière simultanée (Fig I.9.).

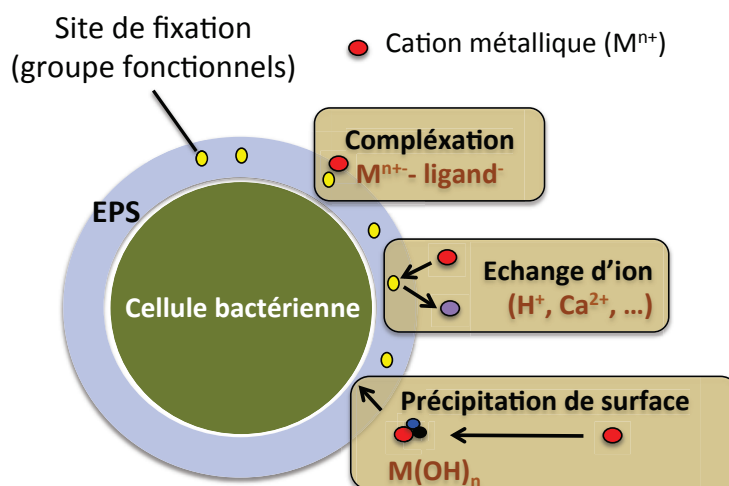


Figure I.9. Les interactions métal-EPS. Exemple de la cellule bactérienne (d'après Li and Yu, 2014).

À pH neutre, les groupes carboxyles sont chargés négativement. Ils attirent ainsi les cations métalliques chargés positivement par interaction électrostatique et forment des complexes organométalliques (i.e. complexation). Les groupes carboxyles et hydroxyles interviennent dans un premier temps, puis d'autres groupes fonctionnels tels que les acides phosphoriques, les polysaccharides et les phospholipides peuvent se charger négativement pour fournir ainsi, dans un second temps, d'autres sites de liaisons pour les cations métalliques. Les groupes carboxyles et phosphates constituent les groupes fonctionnels principalement impliqués dans la fixation métallique. Ainsi, l'affinité du métal pour la matrice EPS dépend fortement de la composition de celle-ci. À pH élevé, les protons (H^+) en solution sont moins nombreux, et la compétition avec le métal pour la fixation aux sites de liaisons de la matrice EPS diminue, menant ainsi à une augmentation de l'adsorption métallique (i.e. échange d'ion) (Comte *et al.* 2006; Lopez *et al.* 2000). En complément aux protons, d'autres cations, comme Na^+ et Ca^{2+} , sont aussi susceptibles d'entrer en compétition avec le métal (Yuan *et al.* 2010). En plus des échanges d'ions et de la complexation, la précipitation de surface contribue aussi à la fixation métallique sur la matrice EPS. En milieu aqueux, la spéciation métallique est fortement influencée par le pH (Dong *et al.* 2013; Singh and Kalamdhad, 2012). En effet, avec l'augmentation du pH, le métal passe d'un état hydraté à un état précipité (i.e. précipitation de surface). Le précipité $Cu(OH)_2$ est la forme majeure du Cu aux alentours d'une valeur de pH de 6,6. Ainsi, à pH neutre ou alcalin, le Cu peut facilement précipiter à la surface de la matrice EPS (Fang *et al.* 2010).

Après l'assimilation du Cu par la cellule, ce sont les systèmes d'efflux et de séquestration cellulaire qui prennent le relais. Les systèmes d'efflux sont largement utilisés

par les bactéries, afin d'excréter les métaux en dehors de la cellule. Ces types de transporteurs se caractérisent par une forte affinité au substrat et permettent de maintenir de faibles concentrations métalliques dans le cytosol (Mergeay *et al.* 1987; Nies and Silver, 1995 ; Nies, 2003). L'élément central de l'homéostasie du Cu est représenté par l'ATPase de type P, appelée CopA. Elle est localisée dans la membrane interne où elle assure l'export des ions Cu^+ depuis le cytoplasme vers le périplasme (une étape de réduction du Cu^{2+} en Cu^+ , à la membrane plasmique, est réalisée au préalable), l'énergie nécessaire provenant de l'hydrolyse de l'ATP (Rensing *et al.* 2000) (Rensing and Grass, 2003). Les algues utilisent aussi des systèmes de pompe à efflux, permettant d'excréter les métaux sous des formes différentes et potentiellement moins toxiques (Stokes, 1983 ; Sunda and Huntsman, 1998 ; Worms *et al.* 2006).

La séquestration intracellulaire des métaux est un mécanisme de défense principalement utilisé par les organismes phototrophes (micro-algues et cyanobactéries), afin de diminuer la toxicité métallique, en jouant sur la biodisponibilité du métal. Il existe différents chélateurs métalliques qui agissent dans la cellule (Worms *et al.* 2006). La fixation du métal au glutathion permet d'augmenter le niveau de glutathion sous son état oxydé (GSSG), menant ensuite à l'activation de différents mécanismes de détoxification. Les acides aminés (proline, cystéine, histidine...) fixent et séquestrent le métal au niveau du cytosol, alors que les métallothionéines (Mt) et les acides organiques (citrate, malate et oxalate) transportent et séquestrent le métal au niveau de la vacuole. Les Mt, synthétisées par les micro-algues (classe II et III, selon le positionnement des cystéines) (Sunda and Huntsman, 1998 ; Moreli and Scarano, 2004 ; Kaxakami *et al.* 2006 ; Le Faucheur *et al.* 2005, 2006 ; Morelli *et al.* 2009), les cyanobactéries (classe III, ou aussi appelées phytochélatines) et quelques bactéries du genre *Pseudomonas* (Blindauer *et al.* 2002 ; Enshaei *et al.* 2010), confèrent des sites de liaisons aux ions métalliques de haute affinité, de par leur groupement thiol des résidus cystéines. La synthèse de Mt est induite par la présence des ions métalliques dans le milieu, tel que le Cu^{2+} . Le Faucheur *et al.* (2006) ont montré que la synthèse de Mt était induite chez l'algue verte d'eau douce *Scenedesmus vacuolatus* à des concentrations en Cu^{2+} de 5 ng L^{-1} . Les Mt possèdent des domaines reconnus par les vacuoles. Ainsi, les complexes « Mt - ion métallique » sont captés et transportés dans la vacuole, par transport actif. L'ion métallique ainsi séquestré dans la vacuole, la cellule microbienne est protégée de la toxicité métallique. (Pereales-Vela *et al.* 2006). Il en est de même pour les bactéries qui sont capables de séquestrer de grandes quantités de cations métalliques par l'intermédiaire de granules de polyphosphates ou des groupements thiols (Keasling *et al.* 1998; Finlay *et al.*

1999; Gadd, 2000; Sanchez *et al.* 2007). La bioaccumulation des métaux et leur stockage subséquent dans la cellule sous forme inerte permet ainsi à la cellule de diminuer leur toxicité. L'immobilisation intracellulaire du métal, sans séquestration dans un organite cellulaire, est aussi réalisée par les algues, par association du métal avec les sulfates au sein de granules, ou encore dans des corps polyphosphatés (Stokes, 1983 ; Stauber and Florence, 1987 ; Megharaj *et al.* 2003 ; Amiard-Triquet *et al.* 2006).

Enfin, la dilution des concentrations métalliques, par augmentation du taux de croissance, est aussi un mécanisme de défense utilisé par les microorganismes (Sunda and Hunstman, 1998 ; Luoma and Rainbow, 2005). En effet, l'augmentation de la densité cellulaire offre une surface de contact plus grande, menant ainsi à la dilution des concentrations en métaux par cellule (Megharaj *et al.* 2003 ; Luoma and Rainbow, 2005).

3. La température, un paramètre environnemental majeur à prendre en compte dans l'évaluation de la réponse du biofilm à une exposition métallique.

3.1. Influence des paramètres environnementaux sur la sensibilité des communautés microbiennes aquatiques à l'exposition métallique

Les facteurs environnementaux sont susceptibles de modifier la sensibilité des communautés microbiennes aux contaminants. Par exemple, Villeuneuve *et al.* (2010) ont observé que l'intensité lumineuse et les conditions hydrodynamiques du milieu influençaient significativement la structure et la diversité des biofilms de rivière. Par conséquent, ils ont suggéré, au regard du lien étroit entre la diversité et les fonctions des communautés microbiennes, une modification possible de la réponse du biofilm aux contaminants. Sabater *et al.* (2002) ont observé des effets croisés entre la vitesse du courant et la pollution métallique, montrant que l'épaisseur réduite du biofilm, liée à l'action du courant, représente aussi un paramètre primordiale, influençant les effets du Cu, du Zn et du Cd sur la production du biofilm. D'autre part, les pollutions métalliques sont très souvent associées à une eutrophisation du milieu aquatique (Lopez-Flores *et al.* 2003), notamment en milieu agricole, du fait de l'utilisation conjointe des engrais et des produits phytosanitaires, notamment ceux qui comportent du Cu. De nombreuses études visent à évaluer la toxicité métallique en fonction des conditions nutritives du milieu, notamment sur le phytoplancton et les biofilms phototrophes (Wang and Dei, 2001 ; Interlandi, 2002 ; Ivorra *et al.* 2002 ; Riedel and Sanders, 2003 ; Guasch *et al.* 2004). Il a ainsi été montré que l'augmentation des concentrations en phosphore dans le milieu réduisait la toxicité métallique sur les algues vertes, telles que *Stigeoclonium tenue* (Harding and Whitton, 1977), *Hormidium rivulare* (Say and Whitton, 1977) et *Pseudokirchneriella subcapitata* (Chen, 1994). À l'échelle de la communauté, Serra *et al.* (2010) ont montré que la tolérance de biofilms phototrophes au Cu évoluait dans le même sens que le gradient de concentration en phosphore du milieu. En effet, le niveau de tolérance au Cu des communautés phototrophes en condition eutrophe était environ 4 fois plus élevé qu'en condition oligotrophe. De la même manière, Guasch *et al.* (2004) ont observé que les communautés phototrophes de biofilm concernées par un apport en phosphore en concentration non limitante étaient 3 fois plus tolérantes au Cu que les communautés concernées par un apport en phosphore en concentrations limitantes. Concernant le compartiment hétérotrophe, Tlili *et al.* (2010) ont aussi montré que l'augmentation des

niveaux de tolérance des communautés bactériennes au Cu, suite à une exposition de 3 semaines à ce métal, était accentuée par un enrichissement du milieu en phosphore. Deux hypothèses ont été posées, à savoir (i) une complexation et une précipitation du Cu par les phosphates, diminuant ainsi les concentrations en ions libres, et par conséquent la biodisponibilité de ce métal et/ou (ii) la formation de corps polyphosphatés, qui offrent des sites de fixation aux métaux, permettant ainsi la séquestration du Cu.

Bonet *et al.* (2013) ont montré que les concentrations en phosphore, mais aussi les variations saisonnières (température et intensité lumineuse), conditionnaient la réponse des communautés bactériennes de biofilm au Zn, au niveau de leur activité enzymatique antioxydante. Ainsi, de nombreux auteurs soulignent le fait que la variabilité des facteurs environnementaux complexifie grandement l'établissement de lien de causalité entre l'exposition métallique et les effets biologiques observés (Bonnineau, 2011 ; Ricciardi *et al.* 2009 ; Culp *et al.* 2000).

3.2. Influence de la température sur la réponse des microorganismes aquatiques à l'exposition métallique

Si l'influence des conditions hydrodynamiques et nutritives sur la toxicité métallique est relativement bien appréhendée, de manière générale, le nombre d'études qui concerne l'influence de la température sur les effets des métaux sur les communautés microbiennes aquatiques reste assez limité.

Zeng and Wang (2011) ont évalué l'influence de la température sur la réponse de la cyanobactérie d'eau douce *Microcystis aeruginosa* à une exposition au cadmium (Cd) et au zinc (Zn). Ils ont observé que les concentrations intracellulaires en Cd à 30°C étaient de 1,5 à 2,3 fois plus élevées qu'à 18°C. De même, pour les concentrations intracellulaires en Zn, celles-ci étaient de 1,4 à 1,9 fois plus élevées à 30°C qu'à 18°C. Malgré une augmentation de la bioaccumulation du Zn et du Cd avec la température, ils n'ont pas observé de diminution de la croissance algale et de l'activité photosynthétique. À l'inverse, Oukarroum *et al.* (2012), qui ont étudié les effets d'interactions entre la température et le Cu sur les performances du PS II de l'algue verte *Chlorella vulgaris*, ont observé une augmentation des effets du Cu sur les performances du PS II, lorsque la température augmentait de 4 et 7°C (température initiale de 24°C). Mais contrairement à l'étude de Zeng and Wang (2011), les auteurs suggèrent un changement de spéciation du Cu, qui serait à l'origine d'une plus faible accumulation métallique mesurée à température plus élevée.

À l'échelle de la communauté, Val *et al.* (2015) ont observé une diminution de la tolérance des communautés algales de biofilm de rivière au mercure (Hg), mesurée par approche « PICT », sur la base de la mesure du rendement photosynthétique, suite à une augmentation de la température de 5°C (températures initiales de 17, 19 et 22°C, selon le site de prélèvement). En conditions contrôlées (i.e. étude en mésocosmes), Alsterberg and Sundbäck (2013) ont observé, l'inhibition des effets du Cu pyrithione (substance antifouling), sur des communautés algales benthiques et planctoniques, suite à une augmentation de 4°C (températures initiales comprises entre 9 et 16°C).

Concernant le compartiment hétérotrophe, Boivin *et al.* (2005) ont étudié l'influence de la température sur les niveaux de tolérance au Cu des communautés bactériennes de biofilm, mesurés par approche « PICT », et sur la base de leur capacité d'utilisation de différents substrats carbonés (BIOLOG[®]). Ils ont noté que le niveau de tolérance des communautés bactériennes de biofilm était 6 fois plus élevée à 20°C qu'à 10 et 14°C. De même, Faburé *et al.* (2015) ont observé que la tolérance au Cu de biofilm hétérotrophe de rivière, évaluée par approche « PICT » et sur la base de la mesure de l'activité β -glu, était 4 fois plus élevée en hiver (7,5°C) qu'en été (20,2°C), les concentrations en Cu dissous dans le milieu étant relativement constantes au cours des saisons. D'après Crain *et al.* (2008), le mode d'interaction (i.e. additif, synergique ou antagoniste) peut dépendre (i) de la manière dont la température affecte le toxique et sa biodisponibilité (ii) des changements dans les interactions chimiques (Noyes *et al.* 2009), (iii) de la physiologie et des niveaux trophiques de l'organisme considéré (Christensen *et al.* 2006) et (iv) de l'approche expérimentale mise en œuvre. Concernant ce dernier point, Crain *et al.* (2008) ont noté que les expériences en mésocosmes (modèles expérimentaux *outdoor*, placés dans le milieu naturel) tendent plus souvent vers des effets antagonistes (i.e. effets résultants inférieurs aux effets de chaque stress séparés), alors que les expérimentation de laboratoire tendent vers des effets synergiques (i.e. effets résultants supérieurs aux effets de chaque stress séparés). L'explication possible serait que plus les communautés utilisées en tant que modèle expérimental sont complexes (i.e. communautés testées en mésocosme), plus les effets directs des stress sont masqués ou modulés (Fleege *et al.* 2003, Crain *et al.* 2008). Val *et al.* (2005) soulignent aussi la difficulté d'appréhender les interactions entre le métal et la température, à des niveaux d'organisation complexe que représentent la population et la communauté. Pour palier ce manque, il est donc nécessaire de produire un effort de recherche pour mieux évaluer l'influence possible de la température sur la réponse des communautés microbiennes de biofilms aux métaux.

Chapitre II

Matériel et méthodes

1. Procédures expérimentales

1.1. Site de prélèvement du biofilm

Dans le cadre de ces travaux de thèse, nous nous sommes appuyés exclusivement sur des approches expérimentales, qui reposaient sur l'utilisation de microcosmes de laboratoire. Toutefois, les expérimentations ont été réalisées à partir de biofilm « naturel », prélevé dans la rivière Morcille, afin de conserver, tant que possible, une dimension écologique dans nos approches écotoxicologiques.

Le bassin versant (BV) de la Morcille (9,5 km²) est situé au nord du département du Rhône, dans le Haut-Beaujolais, entre la bordure orientale du Massif Central et l'extrémité ouest de la vallée de la Saône (Fig II.1). Ce BV est soumis à une forte pression anthropique, du fait de son activité viticole. Il constitue un sous-bassin de l'Ardières (220 km²), avec lequel il compose le site atelier Ardières-Morcille (SAAM), intégré dans la zone atelier du bassin du Rhône (ZABR). Ce site atelier fait l'objet de suivis réguliers depuis plus de 20 ans dans une démarche pluridisciplinaire, qui repose majoritairement sur des approches de chimie, de physique, d'écologie et d'écotoxicologie. La surface du BV drainée par la Morcille est caractérisée par une augmentation de la proportion relative des surfaces de vignes de l'amont (7%) vers l'aval (69%). Ainsi, il en résulte un gradient chimique de concentrations en nutriments (principalement le phosphore), pesticides (principalement des fongicides tels que le diméthomorphe et le tébuconazole) et métaux (Cu, Zn et As). Concernant les métaux, le BV de la Morcille est principalement caractérisé par un gradient de concentrations en Cu (Rabiet *et al.* 2008), puisque cet élément est largement utilisé sous forme de sulfate dans le cadre de la viticulture. Les caractéristiques de ce BV en font donc un site de choix pour évaluer l'impact de ce type de polluant sur les communautés microbiennes (Montuelle *et al.* 2010).

Trois sites d'échantillonnage sont généralement privilégiés pour la caractérisation chimique et biologique du cours d'eau : un site amont, considéré comme site de référence et dénommé « Saint-Joseph »; un site intermédiaire, dénommé « Versauds »; et un site aval, dénommé « Saint-Ennemond ». Par conséquent, dans le cadre de ce projet de thèse, le biofilm utilisé comme modèle d'étude, au cours des différentes expérimentations en microcosmes de laboratoire, a été exclusivement collecté au niveau du site amont « Saint-Joseph »,

relativement peu contaminé par le Cu ($< 0,9 \mu\text{g L}^{-1}$) (Montuelle *et al.* 2010), afin de s'affranchir au mieux de tout historique d'exposition du biofilm à ce métal.

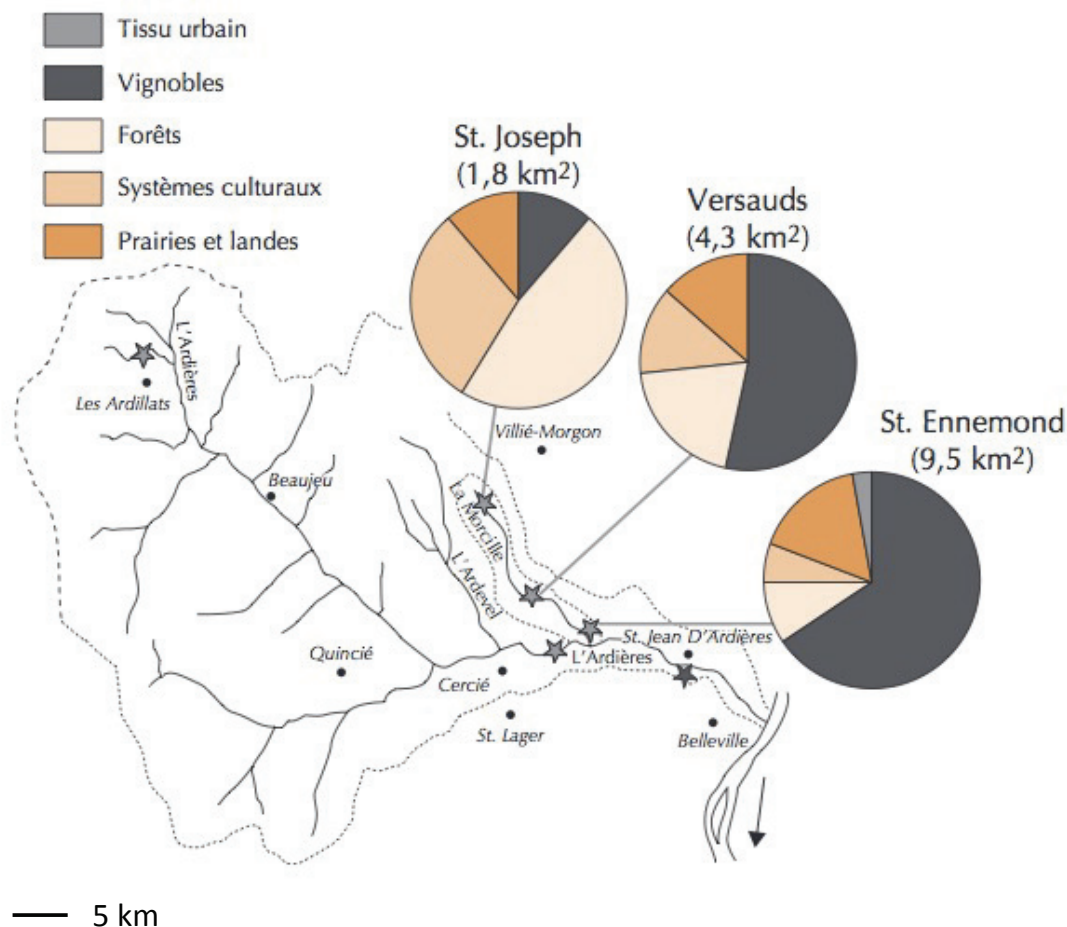


Figure II.1. Localisation des trois principales stations d'échantillonnage sur le bassin versant de la Morcille, dont celui de Saint-Joseph, site de prélèvement du biofilm choisi dans le cadre de notre étude. Pour chaque station sont indiquées la superficie drainée par le cours d'eau et son occupation des sols (Pesce *et al.* 2009).

1.2. Système expérimental et protocoles de préparation des expérimentations

1.2.1. Système expérimental

Le système expérimental, représenté sur la figure II.2., utilisé tout au long de ce projet de thèse, a reposé sur l'utilisation de microcosmes, représentés par des aquariums de verre d'une capacité de 20 L (L40×l20×H25cm). Certains microcosmes étaient utilisés comme témoins (sans ajout de Cu) et d'autres étaient contaminés au Cu. Une pompe submersible a été disposée dans chaque microcosme, afin de maintenir l'agitation de l'eau ($\sim 1.2 \text{ L min}^{-1}$) et l'oxygénation, en circuit fermé. Des bacs de rétention en polypropylène (L121×l81×H33cm), contenant 250 L d'eau déminéralisée, reliés à des groupes réfrigérants, ont permis la

régulation thermique des microcosmes. Trois pompes submersibles ($\sim 1.2 \text{ L min}^{-1}$) ont été également disposées dans chaque bac de rétention, afin d'homogénéiser la température de l'eau. Un bac de rétention, correspondant à une température testée, était susceptible de contenir jusqu'à six microcosmes. Des lampes HPS (High Pressure Sodium, 400 W) ont été disposées au-dessus de chaque bac de rétention, afin d'assurer un éclairage d'intensité lumineuse constante de 3500 lux ($42.7 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), selon une photopériode jour/nuit de 13 h/11 h.

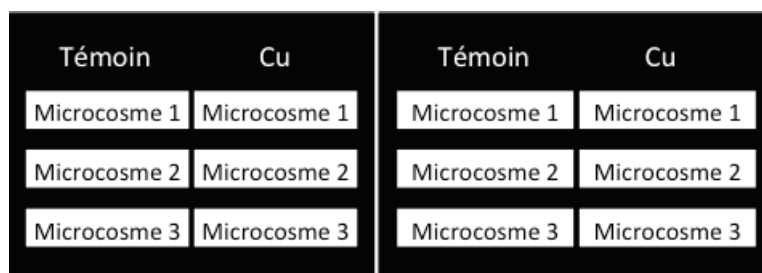
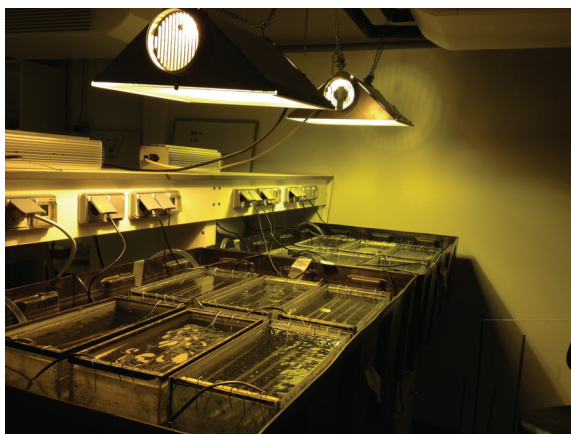


Figure II.2. Système expérimental représentant deux bacs de rétention thermorégulés (i.e. deux températures testées) avec leurs microcosmes (au-dessus), et schématisation des microcosmes disposés dans ces deux bacs de rétention (en-dessous).

Afin de permettre le développement du biofilm, des réglettes en plastique contenant une dizaine de lames de verre pour microscope ($7.5\text{cm} \times 2.5\text{cm}$, surface colonisable recto-verso de 36 cm^2) ont été suspendues dans chaque microcosme (Fig II.3.).

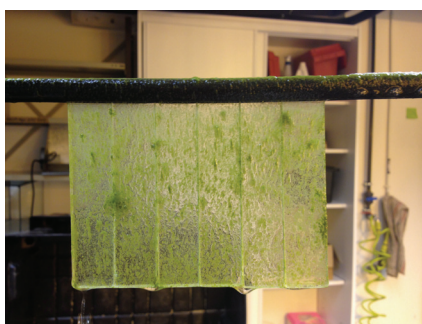


Figure II.3. Lames de verre disposées sur une réglette et colonisées par le biofilm

1.2.2. Inoculation de la suspension de biofilm

L'inoculation initiale des communautés naturelles a été réalisée de la même manière pour l'ensemble des expérimentations. Des cailloux, récoltés au préalable sur le site de Saint Joseph (voir § 1.1), ont été grattés à l'aide de brosses à dent et d'eau du milieu de prélèvement. Après homogénéisation par agitation manuelle de la suspension de biofilm obtenue, celle-ci a été ajoutée en volume équivalent, à chaque microcosme.

Avant l'inoculation de la suspension de biofilm, l'eau déminéralisée des bacs de rétention a été préalablement thermorégulée et les microcosmes ont été alimentés en eau. Cette eau était de nature différente selon le site d'implantation Irstea où s'est déroulée l'expérimentation considérée². Le tableau II.1. décrit les caractéristiques physico-chimiques des deux types d'eau utilisée, ainsi que celles du milieu de prélèvement du biofilm (i.e. site de St Joseph de la rivière Morcille). Les principaux nutriments, nécessaires au développement du biofilm, ont été ajoutés à des concentrations proches de celles mesurées régulièrement dans la rivière Morcille, à savoir des concentrations finales de 0,2 mg L⁻¹ en PO₄, 8 mg L⁻¹ en NO₃ et 15 mg L⁻¹ en SiO₂ (Dorigo *et al.* 2010).

	Eau de la Morcille	Eau de FOS	Eau reconstituée
	St Joseph, site de prélèvement	FO du quai Chauveau - Lyon	FO du site de la Doua - Villeurbanne
pH	7,1 - 8,0	7,4	7,0
Conductivité (µS cm ⁻¹)	91 - 160	150	150
COD (mg L ⁻¹)	2,2 - 3,8	0,5	< 0,5
PO ₄ (mg L ⁻¹)	0,04 - 0,10	0,20	0,20
NO ₃ (mg L ⁻¹)	4,2 - 7,7	8,0	8,0
SiO ₂ (mg L ⁻¹)	14 - 20	15	15
HCO ₃ (mg L ⁻¹)	30 - 40	80	50 - 95
Ca (mg L ⁻¹)	8 - 13	43	16 - 34
Mg (mg L ⁻¹)	2,4 - 3,4	3,0	1,7 - 2,1
Na (mg L ⁻¹)	11 - 13	14	3 - 8
K (mg L ⁻¹)	< 1	< 1	< 1
Cl (mg L ⁻¹)	17 - 25	33	4 - 5

Tableau II.1. Caractéristiques physico-chimiques des eaux utilisées lors des expérimentations en microcosmes, et de l'eau du site de prélèvement du biofilm. L'eau reconstituée repose sur un mélange 1 : 3 (v:v) d'eau de FO et d'eau déminéralisée. Les valeurs grisées représentent les concentrations nominales des nutriments ajoutés dans l'eau considérée. Les caractéristiques physico-chimiques concernant l'eau du site de prélèvement correspondent aux mesures effectuées de manière mensuelle ($n = 12$) au cours de l'année 2012, au niveau du site de St Joseph (valeurs minimales et maximales). FO, eau de forage ; FOS, eau de forage osmosée.

²

Des eaux différentes ont été utilisées, pour cause de déménagement en octobre 2012 des laboratoires d'Irstea, du quai Chauveau de Lyon vers le site de la Doua à Villeurbanne. Les eaux utilisées reposent en partie sur de l'eau prélevée dans la nappe de forage du site considéré ; il n'a donc pas été possible d'utiliser une eau strictement similaire en terme de qualité physico-chimique tout au long des travaux de thèse.

Avant l'inoculation du biofilm, les microcosmes concernés par une exposition au Cu ont été dopés avec une solution de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, afin d'obtenir une concentration finale en Cu d'environ $15 \mu\text{g L}^{-1}$ (Chapitre III, VI et VII) ou de $60 \mu\text{g L}^{-1}$ (Chapitre IV) selon l'expérimentation considérée. Au préalable, ces aquariums ont été saturés en Cu durant 24 h, à une concentration identique à celle testée lors de l'exposition, afin d'éviter des phénomènes d'adsorption sur le matériel expérimental.

1.2.3. Renouvellement du milieu d'exposition

Chaque semaine, l'eau des différents microcosmes a été renouvelée. Les mesures physico-chimiques réalisées directement dans les microcosmes (pH, conductivité, oxygène dissous) et les prélèvements d'eau réalisés en vue de doser les éléments chimiques majeurs et les concentrations en Cu dissous, ont été effectués avant et 2 h après chaque changement d'eau. Ceci a ainsi permis de suivre l'évolution du contexte environnemental au cours de la semaine qui a suivi chaque renouvellement d'eau.

1.3. Stratégie expérimentale générale

Afin de répondre aux questions posées (voir Introduction Générale), deux grandes expérimentations en microcosmes ont été mises en œuvre. L'une a été réalisée avec des communautés hivernales (Chapitre III) et l'autre avec des communautés estivales de biofilm (Chapitre VI), toutes prélevées dans la rivière Morcille au site « Saint Joseph ». La figure II.4. décrit le calendrier expérimental général suivi au cours de ces deux expérimentations.

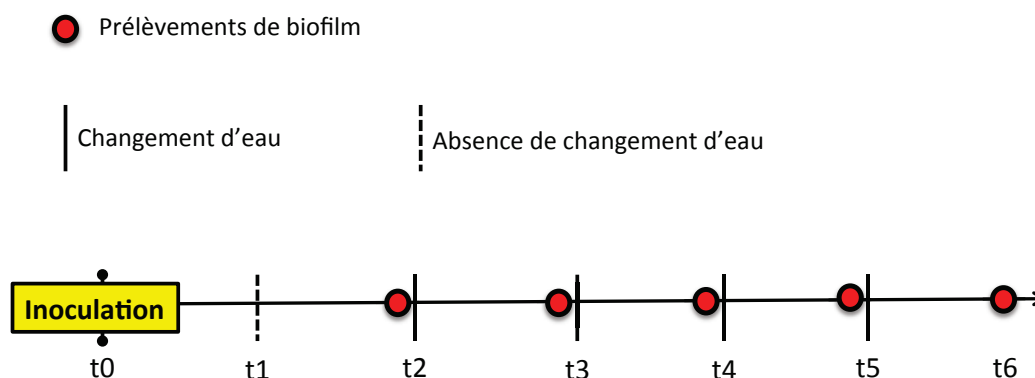


Figure II.4. *Calendrier expérimental général.* Le laps de temps entre deux t consécutifs représente une semaine de développement du biofilm.

Le temps t_0 correspond à l'inoculation de la suspension de biofilm. Aux semaines t_0 , t_2 , t_3 , t_4 , t_5 et t_6 , des prélèvements de biofilm, réalisés par grattage des lames de verre à l'aide d'une lame de rasoir et d'eau (mélange équivalent d'eau minérale Volvic, France et d'eau minéralisée), ont été effectués, afin de réaliser les différentes mesures, permettant de caractériser la réponse du biofilm (voir § 3.), ainsi que des prélèvements d'eau afin de réaliser les mesures physico-chimiques nécessaires à la caractérisation du milieu d'exposition (voir § 2.). Jusqu'au temps t_2 , l'eau des microcosmes n'a pas été changée et le biofilm n'a pas été prélevé, afin de permettre l'adhésion des cellules microbiennes au substrat artificiel et l'adaptation du biofilm en formation aux conditions expérimentales. La stratégie expérimentale détaillée de chacune des expérimentations est décrite en introduction du chapitre qui leur est consacré.

Le tableau II.2. décrit synthétiquement les objectifs visés plus spécifiquement dans chacune des expérimentations réalisées, et liste les principaux paramètres mesurés pour y parvenir.

Etudes	Périodes	Principaux objectifs et communautés considérées	Principaux paramètres mesurés
Chapitre III <u>Article 1</u>	Hiver février 2012	Appréhender l'influence de la température sur les effets du Cu Communautés phototrophes	Structure : biomasse et répartition des classes algales Fonction : activité photosynthétique Bioaccumulation
Chapitre IV <u>Article 2</u>	avril 2013	Optimisation des tests de toxicité (PICT) Evaluer l'influence de la biomasse et du stade de maturation du biofilm et de la durée d'exposition sur la mesure des niveaux de tolérance au Cu Communautés phototrophes	Tolérance au Cu (CE_{50}) : Mesure de l'efficacité photosynthétique
<u>Article 3</u>	mai 2014	Optimisation des tests de toxicité (PICT) Evaluer l'influence des conditions thermiques sur l'acquisition et la mesure de la tolérance au Cu Communautés phototrophes	Tolérance au Cu (CE_{50}) : Mesure de l'efficacité photosynthétique Répartition des classes algales et structure diatomique
Chapitre V	juillet 2014	Développer un protocole d'extraction de la matrice EPS	Bioaccumulation du Cu
Chapitre VI <u>Article 4</u>	Eté septembre 2014	Evaluer l'influence de la température sur la sensibilité du biofilm au Cu Communautés phototrophes Comparer la réponse des communautés phototrophes et hétérotrophes Comparer de la réponse des communautés estivales et hivernales Communautés phototrophes	Tolérance au Cu (CE_{50}) : Mesure de l'efficacité photosynthétique Structure diatomique Bioaccumulation Comparaison des niveaux de tolérance au Cu (CE_{50}) Comparaison des effets du Cu sur structure et fonction

Tableau II.2. Stratégie d'étude adoptée pour chaque expérimentation. Les expérimentations, liées aux développements méthodologiques réalisés, sont représentées en violet et les expérimentations, qui visent à répondre aux trois objectifs proposés en introduction générale, sont représentées en vert.

2. Caractérisation physico-chimique du milieu d'exposition et des biofilms

2.1. Paramètres généraux

Aux cours des différentes expérimentations, **la température de l'eau** (°C) et **l'intensité lumineuse** (lux ou $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ont été relevées, grâce à des capteurs déposés au centre de chaque bac de rétention thermorégulé. Des mesures physico-chimiques ont été réalisées directement dans les microcosmes, avant et 2 h après chaque changement d'eau, afin de suivre les paramètres suivants :

- **Le pH** (caractérisation du degré d'acidité ou d'alcalinité du milieu, par mesure de la concentration en ions hydrogènes H^+), qui renseigne sur les modifications possibles de la spéciation du Cu et donc sa biodisponibilité.
- **La conductivité** (aptitude d'une eau à conduire le courant électrique, en $\mu\text{S cm}^{-1}$), qui dépend de la teneur de l'eau en sels dissous. Elle permet une bonne appréciation des matières dissoutes.
- **L'oxygène dissous** (mg L^{-1}), et le pourcentage de saturation en oxygène dissous, qui renseignent sur les bonnes conditions d'oxygénation du milieu.

L'oxygène dissous, la conductivité et le pH ont été respectivement mesurés à l'aide d'un oxymètre (WTW Oxi 323-B/Set), d'un conductimètre (WTW Cond 3210/Set2) et d'un pHmètre (WTW 3210 electrode sentix 41-3). Le pH a également été suivi en continu selon l'expérimentation considérée, avec une sonde multiparamètres pH-température (WTW 340i). La température de l'eau des bacs de rétention ainsi que l'intensité lumineuse ont été mesurées avec des capteurs de données (HOBO® Pendant Temperature/Light), toutes les 2 h, et tout au long du suivi.

En complément, des prélèvements d'eau ont été effectués avant et 2 h après chaque changement d'eau, afin de suivre l'évolution des concentrations pour les éléments majeurs suivants :

- **Le carbone organique dissous (COD)**, qui renseigne sur la production et la dégradation de la MOD, qui joue un rôle important dans la détermination de la spéciation et de la biodisponibilité du Cu ;

- **Les nitrates (NO_3^-), les phosphates (PO_4^{2-}) et le dioxyde de silicium (SiO_2)**, qui constituent les nutriments essentiels au développement du biofilm, ainsi que **l'ammonium (NH_4^+) et les nitrites (NO_2^-)**, issus de l'activité microbienne et qui renseignent sur le fonctionnement du cycle de l'azote ;

- **Les ions hydrogénocarbonates (HCO_3^-)**, qui renseignent sur l'alcalinité de l'eau et sont susceptibles de modifier la spéciation métallique et donc la biodisponibilité du Cu, les cations majeurs, tels que **le calcium (Ca^{2+}), le magnésium (Mg^{2+}), le potassium (K^+) et le sodium (Na^+)**, qui peuvent rentrer en compétition avec le Cu et modifier ainsi la toxicité métallique, et les anions majeurs tels que **le chlore (Cl^-)**, qui renseigne sur la force ionique.

Le tableau II.3. décrit les normes utilisées pour mesurer les concentrations des éléments majeurs considérés. Les analyses ont été réalisées par le Laboratoire de chimie des milieux aquatiques (LAMA) d'Irstea de Lyon-Villeurbanne.

Orthophosphates (PO_4)	NF EN ISO 6878
Nitrates (NO_3)	NF EN ISO 10304
Nitrites (NO_2)	NF EN 26777
Ammonium (NH_4)	NF T 90-015-2
Dioxyde de silicium (SiO_2)	NF T 90-007
Carbone organique dissous (COD)	NF EN 1484
Calcium (Ca)	NF EN ISO 14911
Magnésium (Mg)	NF EN ISO 14911
Potassium (K)	NF EN ISO 14911
Sodium (Na)	NF EN ISO 14911
Chlore (Cl)	EN ISO 10304-1
Hydrogénocarbonate (HCO_3)	NF EN ISO 9963-1

Tableau II.3. Normes des mesures des concentrations en éléments majeurs.

2.2. Evaluation du niveau d'exposition au cuivre

2.2.1. Mesure des concentrations en cuivre dissous

Il est possible de doser le Cu sous forme dissoute, particulière ou totale. Au cours des différentes expérimentations, nous avons choisi de doser la fraction potentiellement biodisponible pour le biofilm, et donc de ne suivre que les concentrations en Cu dissous, puisque les microcosmes ont été dopés en Cu dissous uniquement (pas de fraction particulière apportée). Ce paramètre a été mesuré avant et 2 h après chaque changement d'eau, afin de

suivre son évolution au cours du temps. Ainsi, le Cu dissous a été mesuré dans la phase liquide, récupérée après filtration sur membrane de porosité 0,45 μm (polyfluorure de *vinylidène*, PVDF, Whatman). Les échantillons d'eau filtrés ont été acidifiés à l'acide nitrique (HNO_3) 0,5% v/v (14 M Suprapur), puis conservés à 4°C jusqu'à analyse.

Les mesures des concentrations en Cu dissous ont été réalisées par spectrométrie de masse à plasma induit (ICP-MS, Inductively coupled plasma mass spectrometry, Thermo X7, Série II), selon la norme NF EN ISO 17294-2. La mesure repose sur l'introduction de l'échantillon d'eau dans un plasma d'argon ; celui-ci est ionisé et les ions sont séparés dans le spectromètre de masse en fonction du rapport masse/charge (m/z). Les rapports m/z sont caractéristiques de l'élément dosé. La détermination des concentrations est réalisée suite à un étalonnage externe à l'aide d'une solution multi-élémentaire (SCP-33MS, SCP Science) en corrigeant les effets de dérive de l'appareil à l'aide de standards internes (yttrium). La limite de quantification est déterminée selon la norme NF T90-210 (AFNOR, 2009) et est de 0.050 $\mu\text{g L}^{-1}$. L'incertitude élargie (deux fois l'écart type sur 30 mesures) est évaluée à partir du dosage d'une eau certifiée (TM 27.3, certifiée en Cu à $6.16 \pm 0.61 \mu\text{g L}^{-1}$) et est de l'ordre de 10%.

2.2.2. Mesure des concentrations en cuivre bioaccumulé

Afin d'évaluer la bioaccumulation du Cu, les concentrations en Cu ont été mesurées au sein de différentes fractions dans le biofilm. Pour cela, la suspension de biofilm, obtenue après grattage des lames, a été reprise dans 50 mL d'eau (mélange équivalent d'eau minérale ; Volvic, France et d'eau déminéralisée). Ce volume de 50 mL a été divisé en deux fractions de 20 mL. Dans l'une des fractions, 320 μL d'EDTA (0,25 M) ont été ajoutés, afin d'éliminer le Cu « externalisé », lié aux ligands organiques. Une fois les échantillons rincés à l'EDTA, les concentrations en Cu « internalisé », correspondant au Cu « intracellulaire », ont été mesurées. L'autre fraction de 20 mL a été directement soumise à analyse, sans ajout d'EDTA, afin de doser le Cu « total », présent dans l'ensemble des fractions du biofilm. Après 10 minutes d'incubation, avec ou sans EDTA, les échantillons ont été filtrés à l'aide d'un système en polycarbonate sur un filtre en polypropylène (0,45 μm) et relié à une pompe à vide. Les filtres ont été récupérés et séchés au four à 50°C pendant 48 h, pesés après dessiccation, puis conservés à l'obscurité à température ambiante, jusqu'à analyse. Les concentrations en Cu « externalisé » à la surface du biofilm ont été obtenues, en soustrayant les concentrations en Cu « internalisé » des concentrations en Cu « total ». Pour chaque fraction considérée, les

concentrations en Cu ont été rapportées au poids sec du biofilm ($\mu\text{g g}^{-1}$).

Les concentrations en Cu « total », « externalisé » et « internalisé » dans le biofilm ont été mesurées selon la norme NF EN ISO 17294-2, par ICP-MS. La limite de quantification ramenée au poids sec de biofilm, pour une masse typique de 50 mg de biofilm sec, un volume final de 15 ml de minéralisat et une dilution au $1/10^6$ avant analyse est de $0.15 \mu\text{g g}^{-1}$. Les incertitudes ont été évaluées à partir de matériel de référence certifié (BCR 414, plancton certifié en Cu à $29.5 \pm 1.3 \mu\text{g/g}$) et sont de l'ordre de 10.5% (incertitude élargie, 2 fois l'écart-type).

Il est important de noter que les différentes fractions en Cu obtenues avec cette méthodologie, que nous nommerons par la suite « méthodologie interne », et qui a été mise en œuvre uniquement dans les chapitre III, seront reconsidérées dans le cadre des développements méthodologiques du chapitre V, qui ont permis d'améliorer l'évaluation des concentrations de la fraction en Cu liée à la matrice EPS, en s'appuyant sur la méthodologie proposée initialement par Aguilera *et al.* (2008).

3. Caractérisation de la réponse du biofilm

La caractérisation des communautés phototrophes a été réalisée à partir d'une suspension de biofilm obtenue après grattage des lames. Les paramètres structuraux et fonctionnels suivants (voir § 3.1. pour les méthodes d'analyse) ont été mesurés :

- La concentration en chlorophylle *a* (chl *a*), qui permet d'estimer la biomasse algale ;
- La répartition des classes algales (diatomées, algues vertes et cyanobactéries), qui permet de caractériser la structure algale globale du biofilm ;
- L'efficacité photosynthétique (PSII yield), qui reflète l'état physiologique des communautés phototrophes ;
- La diversité diatomique (analyse taxonomique par microscopie), qui fournit une estimation de la complexité des assemblages de diatomées en intégrant le nombre d'espèces et leur abondance relative.

3.1. Méthodes d'analyse de la réponse structurale des communautés phototrophes

3.1.1 Biomasse totale

La biomasse totale a été estimée par mesure du poids sec (PS) et rapportée à la surface des lames grattées. Les suspensions de biofilm ont été filtrées sur des filtres de porosité 1,2 µm (Whatman, GF/C). Ces filtres ont ensuite été séchés à l'étuve à 70-90° C, pendant 24 h, puis pesés (m_1). Au préalable, les filtres ont été calcinés à 500°C pendant 1 h, pesés (m_0) et conservés au dessiccateur jusqu'à utilisation. Chaque pesée s'effectue à l'aide d'une balance de précision. Le PS se calcule de la manière suivante :

$$PS = \frac{1}{S} \times (m_1 - m_0)$$

où :

- S représente la surface analysée du biofilm ;
- m_1 est la masse du filtre après filtration de la suspension et séchage à l'étuve ;
- m_0 correspond à la masse du filtre après calcination et avant filtration de la suspension.

3.1.2 Biomasse et structure de la communauté algale

La biomasse algale, exprimée en $\mu\text{g chl } a \text{ L}^{-1}$, a été estimée à partir de la mesure de la fluorescence de la chl *a*, à l'aide d'un fluorimètre à modulation d'amplitude et de fréquence (Phyto-PAM, Heinz Walz). Ce fluorimètre, présentant 4 longueurs d'ondes d'excitation (470 nm, 520 nm, 645 nm, 665 nm), a permis d'obtenir la répartition des principales classes algales (diatomées, algues vertes et cyanobactéries), sur la base de l'étalonnage initial du Phyto-PAM. Cet étalonnage a été réalisé par le constructeur à partir de trois souches algales représentant chacune des classes étudiées. Elle permet le raisonnement généralisé suivant : en absence de cyanobactérie dans un échantillon, aucun signal (ou très faible) n'est détecté avec une longueur d'excitation de 470 nm, alors qu'un large signal est détecté pour une longueur d'excitation de 645 nm. On peut conclure à la présence d'algues vertes dans un échantillon si un large signal à la longueur d'onde d'excitation de 470 nm et un faible signal à la longueur d'onde d'excitation de 520 nm, sont détectés. À l'inverse, un signal à une longueur d'onde d'excitation de 470 nm et 520 nm est obtenu en présence de diatomées (Kim Tiam, 2013).

3.1.3 Analyse taxonomique des diatomées par microscopie

Ces analyses ont été effectuées par Soizic Morin, chargée de recherche au centre Irstea de Bordeaux (UR EABX). L'identification des diatomées présentes dans les échantillons de biofilm (préalablement fixés au formol 3,7%) a été réalisée d'après l'examen microscopique de leur squelette siliceux (Fig II.5.). La première étape repose sur la digestion de la matière organique par un traitement à l'eau oxygénée (H_2O_2 , 30%) bouillante, durant 10 minutes. Un deuxième traitement, à l'acide chlorhydrique (HCl, 35%) bouillant, pendant 5 minutes, a été parfois nécessaire pour obtenir un nettoyage satisfaisant des frustules (parois de silice hydratée des diatomées, sur lesquelles reposent l'identification spécifique). Ensuite, les résidus d'eau oxygénée et d'acide ont été éliminés par des cycles successifs de centrifugation (5 minutes à 2500 g) et de rinçage à l'eau distillée. Une partie aliquote a été déposée sur une lamelle propre et déshydratée par séchage. La lamelle a été ensuite retournée sur une goutte de résine réfringente, le Naphrax® (Brunel Microscopes Ltd, UK), déposée au préalable sur une lame. Le chauffage a permis de chasser les bulles d'air et d'aboutir à la réalisation de lames permanentes. L'identification des diatomées a été réalisée par l'observation en microscopie photonique (grossissement x1000) des lames préparées, selon la norme NF EN 13946. Un comptage de 400 frustules, au minimum, a été réalisé et les diatomées ont été identifiées selon les références standards (Krammer and Lange-Bertalot, 1986 – 1991) et les

récentes nomenclatures mises à jour, sur la base de la morphologie générale et de l'ornementation des frustules.

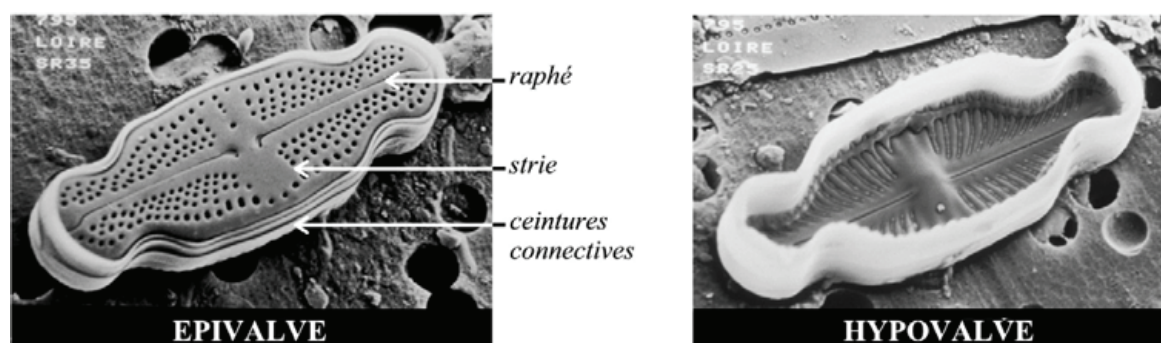


Figure II.5. Structure d'un frustule. Exemple de la diatomée *Luticola ventricosa* (observée au microscope électronique à balayage) (d'après Güttinger, 1999). Les diatomées sont des cellules eucaryotes enchâssées dans une paroi de silice hydratée (le frustule) qui se compose de deux unités imbriquées : l'épivalve et l'hypovalve. Selon les individus, les valves présentent des formes diversifiées et des ornements (e.g. stries, pores, ponctuations) caractéristiques. Ces critères morphologiques sont utilisés pour leur identification jusqu'au niveau de l'espèce, lors de l'examen microscopique (Morin *et al.* 2006).

3.1.4 Mesure de la densité cellulaire algale

Le comptage de cellules algales a été réalisé à partir des échantillons formolés sous grossissement x400, grâce à un microscope photonique LEITZ, à l'aide d'une cellule de comptage de type Nageotte (Marienfeld, Germany). Les échantillons ont été passés au vortex puis homogénéisés par pipetages successifs et éventuellement dilués au besoin selon leur concentration. Un aliquote de 200 μL a été déposé au centre de la cellule de comptage et recouvert par une lamelle planée. Les diatomées, vivantes et mortes, ont été dénombrées dans 10 champs de la zone quadrillée (1,25 μL chacun ; 0,5 mm de profondeur). La distinction entre les cellules vivantes et mortes a été estimée par observation de la turgescence et de la couleur des chloroplastes (Morin *et al.* 2010). Dans les échantillons où les diatomées n'étaient pas dominantes, les différents groupes algaux (chlorophycées, cyanobactéries et diatomées) ont alors été tous quantifiés suivant le même protocole. Les formes de croissance (solitaires vs. coloniales) ont également été recensées. La densité cellulaire, exprimée en nombre de cellules par cm^2 , a été calculée selon la formule suivante :

$$N = \frac{A \times B}{10 \times 1,25 \cdot 10^{-3}} \times \frac{S}{C}$$

où :

- N représente la densité moyenne en cellules par cm^2
- A correspond au nombre de cellules dénombrées dans 10 champs

- B est le facteur de dilution
- S représente la surface grattée en cm^2
- C correspond au volume de reprise en mL
- 10 est le nombre de champs comptés
- $1,25 \cdot 10^{-3}$ correspond au volume d'un champ en mL

3.2 Méthode d'analyse de la réponse fonctionnelle des communautés phototrophes : mesure de l'efficacité photosynthétique

L'efficacité photosynthétique est basée sur la mesure du rendement quantique maximal (F_v/F_m) des communautés phototrophes (Schreiber, 2002). Le rendement quantique optimal reflète la proportion de photosystèmes II (PSII) fonctionnels et, par conséquent, plus généralement l'état physiologique des communautés phototrophes. Les mesures ont été effectuées en utilisant le fluorimètre Phyto-PAM. La fluorescence de la chl a est mesurée à 665 nm sur un échantillon de 3 mL de suspension de biofilm. Une seule impulsion lumineuse saturante a été appliquée pour calculer le rendement quantique maximal selon la formule suivante :

$$F_v/F_m = \frac{F_m - F_0}{F_m}$$

où :

- F_m correspond à la fluorescence maximale obtenue après impulsion lumineuse saturante
- F_0 correspond à la fluorescence de base

3.3 Evaluation de la sensibilité du biofilm au cuivre par approche « PICT »

Dans le cadre de l'approche PICT, l'analyse de la courbe dose-réponse, obtenue après une exposition aiguë, permet de représenter le niveau d'une activité biologique donnée, en fonction du niveau d'exposition à un toxique (ici, le Cu) ou un mélange de toxiques et de déterminer la valeur de la CE_x (concentration efficace qui cause une inhibition de $x\%$ du paramètre biologique mesuré) après modélisation de la courbe dose-réponse obtenue.

L'évaluation des niveaux de tolérance des communautés phototrophes a été réalisée sur la base de la mesure de l'efficacité photosynthétique, et celle des communautés hétérotrophes, sur la base de la mesure des activités β -glucosidase (β -Glu), Leucine-aminopeptidase (Lap) et Phosphatase (Pase). Le même milieu a été utilisé pour réaliser l'ensemble des tests de toxicité aiguë, afin d'éviter des changements de biodisponibilité du Cu. Ainsi, un mélange équivalent d'eau minérale (Volvic, France) et d'eau déminéralisée a été utilisé pour gratter le biofilm, diluer la suspension initiale obtenue après grattage et préparer la gamme semi-logarithmique de concentrations croissantes en Cu, réalisée à partir d'une solution mère de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (320 mg L^{-1}). Les concentrations en Cu, pour chaque point de la gamme, ont été vérifiées par mesures ICP-MS (voir § 2.2.1.).

3.3.1 Communautés phototrophes

Suite aux développements méthodologiques concernant l'optimisation du protocole des tests de toxicité aiguë (voir chapitre IV), celui-ci a été défini de la manière suivante : les concentrations en suspension de biofilm, obtenues après grattage, ont été normalisées par dilution, autour de $2000 \mu\text{g chl } a \text{ L}^{-1}$, cette valeur ayant été vérifiée par mesure au Phyto-PAM (voir § 3.1.2.). Un mélange de 1,8 mL de suspension de biofilm et 0,9 mL des différentes concentrations de Cu (concentrations initiales testées, C1 à C7, comprises entre $0,32$ à 320 mg L^{-1}), a été incubé dans un incubateur (MLR-350 Versatile Environmental Test Chamber, Sanyo), sous intensité lumineuse (1400 lux), à une température d'incubation de 23°C , pendant 2 h, puis 30 min à l'obscurité à température ambiante. Ensuite, les mesures d'efficacité photosynthétique ont été réalisées à l'aide du Phyto-PAM (voir § 3.2.). Pour chaque test de toxicité, nous avons réalisé cinq réplicats analytiques pour le blanc analytique (i.e. la concentration C0 : eau uniquement, afin de déterminer le niveau d'activité optimale des communautés) et trois réplicats analytiques pour les différentes concentrations en Cu testées (C1 à C7).

3.3.2. Communautés hétérotrophes

3.3.1.1. Principe de la mesure des activités enzymatiques

Les activités enzymatiques ont été mesurées par fluorimétrie. Le principe de ces mesures est basé sur l'utilisation d'un ensemble non fluorescent composé d'un fluorogène associé à une molécule analogue au substrat de l'enzyme étudiée (substrat-analogue).

L'hydrolyse enzymatique casse la liaison de cet ensemble, libérant ainsi le fluorogène qui devient fluorescent. Les activités enzymatiques ont ainsi été quantifiées par l'augmentation de la fluorescence, compte tenu du fait que la réaction d'hydrolyse est molaire (1 mole de fluorogène pour 1 mole de substrat libéré).

Les ensembles substrat-fluorogène pour les trois activités enzymatiques qui ont été étudiées sont :

- Le 4-methylumbelliféryl- β -D-glucopyranoside (MUF-Glu), pour la β -glucosidase
- Le L-leucine-7amido-4-methylcoumarin hydrochloride (MCA-Leu), pour la leucine-aminopeptidase.
- Le 4-methylumbelliféryl phosphatase (MUF-P), pour la phosphatase

Les fluorogènes libérés lors de l'hydrolyse enzymatique sont :

- Le 4-methylumbellifère (MUF), pour la β -glucosidase et la phosphatase
- Le 7-amino-4-methyl-coumarin (MCA), pour la leucine-aminopeptidase

3.3.1.2. *Mesure des concentrations saturantes en fluorogènes*

Les quantités de fluorogènes (MUF et MCA) ont été calculées grâce à des gammes étalons de fluorogènes réalisées au préalable (MCA et MUF ; solution mère de 10 mM), permettant d'obtenir une relation entre unité de fluorescence et quantité de fluorogène libérée. En effet, afin d'éviter un effet limitant de substrat mais aussi de comparer les résultats obtenus entre les échantillons, les concentrations saturantes en substrat spécifique ont été déterminées pour chaque activité enzymatique. Pour cela, une première étape d'incubation du biofilm avec une gamme de concentrations croissantes de substrat (allant de 0 μ M à 2000 μ M) est nécessaire. La concentration saturante est déterminée en réalisant une courbe : valeur de fluorescence obtenue = f (Csubstrat). La valeur de cette concentration saturante choisie, correspond à celle où la courbe atteint un plateau.

3.3.1.3. *Tests de toxicité aiguë*

Les concentrations en suspension de biofilm, obtenues après grattage, ont été normalisées par dilution, en se basant sur la mesure de la chl *a* obtenue par le PhytoPam (environ 5000 μ g chl *a* L⁻¹). Un mélange de 1,7 mL de suspension de biofilm et 0,3 mL des

différentes concentrations en Cu (concentrations initiales testées, de C1 à C7, comprises entre 0,032 à 32 mg L⁻¹) a été incubé pendant 1 h à température ambiante, sous agitation, à l'obscurité. Après ajout de 1 mL de substrat-fluorogène (MUF-Glu et MCA-Lap à 750 µM et MUF-P à 3000µM), les échantillons ont été incubés à température ambiante durant 1 h 40 (β-Glu), 1 h (Lap) ou 1 h 30 (Pase). Afin d'arrêter la réaction et d'optimiser la fluorescence, 300 µL de tampon glycine ont été ajoutés (Glycine 0,05 M NH₄⁺OH 0,2 M; pH 10.4). Les échantillons ont été centrifugés 8 min à 20°C à 5292 g puis déposés sur microplaque à 96 puits (300 µL par puit). La fluorescence émise par chacun des deux fluorogènes a été mesurée par un lecteur de microplaque (Biotek Synergy HT) (longueur d'onde : excitation : 360 ± 40 nm ; émission : 460 ± 40 nm). Pour chaque test de toxicité, quatre réplicats analytiques pour la concentration C0 (afin de déterminer le niveau d'activité optimale des communautés) et deux réplicats analytiques pour les différentes concentrations en Cu testées ont été réalisés.

4. Analyses statistiques

Différentes analyses statistiques ont été réalisées, afin d'exploiter les résultats de chaque expérience menée au cours de cette thèse. Le tableau II.4. décrit les analyses statistiques réalisées et les logiciels utilisés, en fonction du paramètre considéré. Ces analyses statistiques nous ont permis ainsi de conclure à la significativité ou non des différences observées entre échantillons.

L'évolution des communautés de diatomées a été caractérisée à l'aide de NMDS (Nonmetric Multidimensional Scaling), en considérant uniquement les espèces présentant une abondance relative supérieure à 1% dans au moins un échantillon, afin de s'affranchir des biais liés à la présence aléatoire d'espèces rares lors des comptages (400 frustules dénombrés pour chaque échantillon).

Les courbes dose-réponse (DRC, Dose-Response Curves) ainsi que les CE_{50} ont été calculées, grâce à la fonction `drm` de la bibliothèque `drc` (Ritz et Streibig 2005), du logiciel R. Le model log-logistique à 4 paramètres est ajusté aux données. Ce modèle est donné par la formule suivante :

$$Réponse = c + \frac{d - c}{1 + \exp\{b \times (\log(Dose) - \log(e))\}}$$

où :

- b représente la valeur de la pente autour de e
- c et d représentent, respectivement, les valeurs limites basse et haute de la courbe
- e correspond à la valeur de la CE_x

Paramètres	Tests	Logiciels
Biomasse algale		
Répartition des classes algales		
Efficacité photosynthétique		
Densité cellulaire	ANOVA + post-hoc HSD Tukey	R (2.15.0) (R Development Core Team 2012)
Paramètres physico-chimiques		
Cu dissous		
Bioaccumulation		
Evolution des assemblages diatomiques	NMDS ; PERMANOVA + post-hoc HSD Tukey	PERMANOVA6 (Anderson 2001)
CE ₅₀	Student	R (2.15.0) (R Development Core Team 2012)

Tableau II.4. *Analyses statistiques réalisées et logiciels utilisés, en fonction du paramètre considéré.*

Chapitre III

Influence de la température sur la réponse
structurale et fonctionnelle de communautés
microbiennes phototrophes hivernales à une
exposition chronique au cuivre

1. Introduction

Peu d'études concernent les effets cumulés de la température et de contaminants chimiques sur les communautés microbiennes aquatiques (Holmstrup *et al.* 2012), contrairement aux macroorganismes (macroinvertébrés, poissons...) (Heugens *et al.* 2001; Holmstrup *et al.* 2010). De ce fait, les effets qui découlent de l'interaction entre la température et le Cu sur les biofilms microbiens restent encore largement méconnus à ce jour.

Seuls Boivin *et al.* (2005) ont étudié l'influence d'une augmentation de la température sur l'acquisition de la tolérance au Cu de communautés bactériennes de biofilm, exposées chroniquement à ce métal (concentration nominale de $191 \mu\text{g L}^{-1}$). Les résultats obtenus ont montré une augmentation d'un facteur 6 de la tolérance au Cu des communautés étudiées, suite à une augmentation de la température de 10°C (température initiale de 10°C). Cependant, les mécanismes mis en œuvre n'ont pas été clairement identifiés dans cette étude ; en effet, Boivin *et al.* (2005) n'ont pas pu démontrer si cette modulation d'effet en réponse à la hausse thermique découlait d'une modification de la biodisponibilité du Cu et/ou d'une augmentation de son effet toxique qui aurait favorisé la mise en place de processus adaptatifs au sein de la communauté bactérienne.

Concernant les microorganismes phototrophes, les travaux menés par Oukarroum *et al.* (2012) à l'échelle de la population ont montré, au contraire, une augmentation de la sensibilité au Cu de l'algue verte *Chlorella vulgaris* avec la température. En effet, ces auteurs ont observé que la diminution des performances photosynthétiques de cette algue verte en présence de Cu (concentration nominale de $318 \mu\text{g L}^{-1}$) était accentuée par une augmentation de la température de 4 et de 7°C (température initiale de 24°C).

Ainsi, ces deux études montrent que l'influence de la température sur la réponse microbienne au Cu peut varier selon le niveau biologique et le type d'organisme étudié. Pour mieux appréhender les interactions entre ces deux paramètres, et leurs conséquences en terme d'impact écotoxicologique à l'échelle des communautés microbiennes, il est donc primordial de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu, qu'ils soient d'ordre biologique ou chimique.

Ce chapitre III, constitué d'un article soumis dans la revue *Environmental Pollution*, décrit la première étude réalisée dans le cadre de la thèse. Cette étude avait pour objectif d'appréhender l'influence possible d'une augmentation de la température sur la réponse de communautés phototrophes de biofilm à une exposition chronique au Cu.

Pour répondre à cet objectif, des biofilms naturels hivernaux, prélevés en février 2012 au niveau de la section amont de la rivière Morcille, dans une eau à 8°C, ont été soumis pendant 6 semaines à 4 niveaux thermiques (8, 13, 18 et 23°C), en présence ou non de Cu, à une concentration proche de celles retrouvées ponctuellement dans la section aval de ce cours d'eau (~15 µg/L). La réponse structurale des communautés phototrophes de biofilm a été évaluée durant tout le suivi par mesure de la biomasse algale et par la caractérisation de la structure algale et de la composition diatomique. En parallèle, la réponse fonctionnelle a été appréciée par mesure de l'activité photosynthétique. En complément et afin d'appréhender l'influence de la température sur l'exposition du biofilm au Cu, la bioaccumulation du Cu a été évaluée en fin de suivi (6 semaines), par mesure des concentrations en Cu dans plusieurs fractions du biofilm (i.e. totale, externalisée et internalisée).

Nous appuyant sur l'hypothèse d'une modification de la structure et du fonctionnement des communautés étudiées en réponse aux stress thermique et toxique appliqués individuellement, nous avons ainsi cherché à expliciter la question des effets qui résultent de l'interaction de ces deux facteurs de stress lorsqu'ils sont appliqués conjointement.

2. Temperature modulates phototrophic periphyton response to chronic copper exposure.

Submitted to Environmental Pollution (24/07/2015)

Anne-Sophie Lambert¹; Aymeric Dabrin¹; Soizic Morin²; Josiane Gahou¹; Arnaud Foulquier^{1,3}; Marina Coquery¹; Stéphane Pesce¹

1. Irstea, UR MALY, 5 rue de la Doua, CS 70077, F-69626 Villeurbanne Cedex, France
2. Irstea, UR EABX, F-33612 Cestas, France.
3. Laboratoire d'Écologie Alpine - UMR CNRS 5553, Université Grenoble Alpes, BP 53, F-38041 Grenoble Cedex 9, France

Abstract

Streams located in vineyard areas are highly prone to metal pollution. In a context of global change, aquatic systems are generally subjected to multi-stress conditions due to multiple chemical and/or physical pressures. Among various environmental factors that modulate the ecological effects of toxicants, special attention should be paid to climate change, which is driving an increase in extreme climate events such as sharp temperature rises. In lotic ecosystems, periphyton ensures key ecological functions such as primary production and nutrient cycling. However, although the effects of metals on microbial communities are relatively well known, there is scant data on possible interactions between temperature increase and metal pollution. Here we led a study to evaluate the influence of temperature on the response of phototrophic periphyton to copper (Cu) exposure. Winter communities, collected in a 8°C river water, were subjected for six weeks to four thermal conditions in microcosms in presence or not of Cu (nominal concentration of 15 µg L⁻¹). At the initial river temperature (8°C), our results confirmed the chronic impact of Cu on periphyton, both in terms of structure (biomass, distribution of algal groups, diatomic composition) and function (photosynthetic efficiency). At higher temperatures (13, 18 and 23°C), Cu effects were modulated. Indeed, temperature increase reduced Cu effects on algal biomass, algal class proportions, diatom assemblage composition and photosynthetic efficiency. This reduction of Cu effects on periphyton may be related to lower bioaccumulation of Cu and/or to selection of more Cu-tolerant species at higher temperatures.

Keywords: Bioaccumulation; Biofilms; Freshwater; Global change; Microbial ecotoxicology; Multi-stress.

2.1. Introduction

Despite the development of more sustainable industrial and agricultural practices, aquatic environments are still highly affected by metal pollution (Luoma and Rainbow, 2008). Among metals, copper (Cu) is ubiquitously present in aquatic environments as a result of both natural and anthropogenic processes, including widespread use as a fungicides and herbicides (Serra and Guasch, 2009). Copper is one of the leading biopesticides in organic farming (Provenzano *et al.* 2010). Synthetic organic fungicides are banned in European organic viticulture, but Cu-based fungicides like CuSO_4 are permitted and even essential for organic wine-growing (EC regulation 473/2002; Komárek *et al.* 2010). Cu is an essential micronutrient for organisms (Scheinberg, 1991) due to its role in redox reaction catalysis, electron transport, nucleic acid metabolism and various enzymatic activities, but at high concentrations it becomes highly toxic for many aquatic-system organisms (Knezovich *et al.* 1981). The predicted no-effect concentration (PNEC) for Cu in water is set at $7.8 \mu\text{g L}^{-1}$ in the EU (Van Sprang *et al.* 2007) but only $1.6 \mu\text{g L}^{-1}$ in France (INERIS, 2015).

Periphyton (or 'biofilm') is a phototrophic and heterotrophic microbial assemblage (including microalgae, bacteria, fungi and heterotrophic protists) embedded in a polysaccharide–protein matrix. In lotic ecosystems like agricultural streams, it provides key ecological functions like primary production and nutrient recycling (Battin *et al.* 2003). Periphytic microbial communities quickly interact with dissolved substances (Sabater *et al.* 2007), including toxicants like metals. Chronic exposure to Cu can functionally impair phototrophic communities by reducing photosynthetic activity (Lambert *et al.* 2012; Soldo and Behra, 2000). It can also impact phototrophic community structure via changes in distribution of algal classes and taxonomic composition of diatom communities (Morin *et al.* 2012; Serra and Guasch, 2009), ultimately increasing phototrophic community tolerance to Cu (Soldo and Behra, 2000; Tlili *et al.* 2010), according to the concept of pollution-induced community tolerance (PICT) first introduced by Blanck and Wängberg (1988).

However, the pollution of surface waters occurs in a wider context of global change, and aquatic systems are generally subjected to multi-stress conditions due to multiple chemical and/or physical pressures. This opens new challenges to improve risk assessment in aquatic ecosystems and better manage aquatic resources (Kundzewicz *et al.* 2008). In a context of climate change driving an increase in extreme climate events (Beniston *et al.* 2007; Orłowsky and Seneviratne, 2012; Smith, 2011), acute temperature changes may prove to be an environmental stressor influencing microbial communities. In particular, temperature

increase can cause structural effects in phototrophic communities by changing algal diversity (Di Pippo *et al.* 2012). It can also impact microbial functions in periphytic assemblages by increasing photosynthesis rate (Hancke and Glud, 2004), accelerating algal growth rates (Diaz Villanueva *et al.* 2011) or enhancing heterotrophic activities such as denitrification (Boulêtreau *et al.* 2012). Furthermore, it has been shown that temperature has a marked influence on chemical toxicity (Holmstrup *et al.* 2010; Noyes *et al.* 2009).

The vast majority of studies on temperature–toxicant (especially metals) interactions have focused on macroorganisms (mainly fish and macroinvertebrates; for review, see Holmstrup *et al.* 2010) and generally report an increase in metal toxicity to aquatic macroorganisms with increasing temperatures (Gupta *et al.* 1981; Heugens *et al.* 2001; Rao and Khan, 2000). However, relevant data on aquatic phototrophic microorganisms is scarce and mainly focused on monospecific algal cultures. At this biological level, Zeng and Wang (2011) observed that Cd and Zn uptake rates in the freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* increased when temperature increased from 18 to 24°C. Contrariwise, a study by Oukarroum *et al.* (2012) on the influence of temperature increase on photosystem performances in *Chlorella vulgaris* under Cu exposure suggested higher temperature led to lower Cu bioavailability following changes in Cu speciation. Developing a PICT approach based on community-level physiological profiles (CLPP) using Biolog™ ECO-plates, Boivin *et al.* (2005) observed that a temperature increase from 10°C to 20°C had very limited effect on the sensitivity of periphytic bacterial communities to copper when they were not previously exposed to this metal. However, previous exposure to Cu (at 191 µg L⁻¹) enhanced copper tolerance, which was increased about 3-fold at 10°C and 14°C, and about 6-fold at 20°C. It revealed a positive influence of the temperature increase on Cu-induced tolerance despite a lack of detectable effect of temperature on bacterial genetic structure (DGGE analysis), bacterial density (based on CFU) and CLPP. Accordingly, Boivin *et al.* (2005) suggested that Cu-induced tolerance was mainly due to adaptation at cellular level, which was enhanced at higher temperature because of a higher internal exposure to Cu. These first results showed that temperature and Cu can have different types of interaction (e.g. synergistic or antagonistic), and it is also known that biological responses can vary according to the kind of organism or biological levels (Crain *et al.* 2008; Moe *et al.* 2013).

Given this background, it appears important to assess the combined effects of temperature and toxicant on phototrophic periphyton. Here we designed an original microcosm approach to assess the influence of temperature on the response of phototrophic periphyton to chronic exposure to Cu. Natural periphyton communities, collected in a 8°C river water, were

incubated at four temperatures (8, 13, 18 and 23°C) and exposed or not to relatively high ($\approx 15 \mu\text{g L}^{-1}$) Cu concentrations. Resulting effects were evaluated in terms of biomass (chlorophyll *a* content), structure (distribution of algal classes), diversity (diatom taxonomic analysis) and phototrophic functions (photosynthetic activity). We first hypothesized that each stressor (i.e. temperature and Cu) applied individually would modify phototrophic community structure and activity, and then addressed the issue of combined effects. Special focus was given to the influence of temperature on phototrophic community exposure to Cu by analyzing Cu concentrations in water and in periphyton.

2.2. Materials and Methods

2.2.1. Experimental setup

The microcosm experiment was carried out in 24 independent glass aquariums (40x20x25cm) incubated in 4 tanks (polyethylene, 250 L, 121x81x33cm) containing water thermoregulated at 8, 13, 18 and 23°C, respectively. The lowest temperature (i.e. 8°C) was identical to the temperature of the sampling site and defined as reference temperature, and 13, 18 and 23°C were the three thermic stress levels tested. In each tank, 6 aquariums were filled with very-low-Cu ($<0.3 \mu\text{g L}^{-1}$) drilled groundwater, which was adjusted to the conductivity and nutrient concentrations (Table 1) of the water at the periphyton sampling site. Each aquarium was fitted with a submersible pump (New Jet 800) to reproduce continuous water flow (water discharge $\sim 1.2 \text{ L min}^{-1}$) and each tank was fitted with three pumps to homogenize water temperature. High-pressure sodium lamps were used to deliver a constant light intensity of 3500 lux ($42.7 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) under a 13 h/11 h light/dark photoperiod. Three aquariums (called “Control”) were used as controls (no Cu added) and three aquariums (called “Cu”) were supplemented with $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ to obtain a Cu concentration close to the highest concentrations recorded in the downstream section of Morcille River (i.e. about $15 \mu\text{g Cu L}^{-1}$; Montuelle *et al.* 2010; Rabiet *et al.* 2015). To avoid Cu adsorption by the experimental equipment, Cu aquariums (including glass slides and pumps) were saturated in the same Cu concentration for 24 hours prior to starting the experiment. All the microcosms were filled with no colonized artificial substrates (glass slides) to allow periphyton settlement during the experiment.

Just before the start of the experiment, stones were collected in a 8°C water in February 2012 at the upstream site of Morcille River (Beaujolais, Eastern France, see Montuelle *et al.*

(2010) for details). The periphyton was scraped and suspended in the river water in order to obtain a periphytic inoculum, which was added at t_0 , in equal volumes, in already thermoregulated (spiked or not with Cu) aquariums. This study was conducted for 6 weeks, from February 1st to March 14th 2012. This study duration was chosen to follow the entire biofilm growth phase (i.e. from initial attachment to maturity), which generally lasts from 4 to 6 weeks (Hillebrand and Sommer, 2000). Water was renewed from the second week. Thus, after one week, only the water level of each aquarium was adjusted and each nutrient was added to maintain the initial trophic conditions. From week 2 to week 6, the water was renewed weekly to maintain a relatively constant exposure level and avoid nutrient depletion. From week 2 to week 6, the main physical-chemical parameters were measured before and 2 h after each water renewal. pH, conductivity, and dissolved oxygen concentrations were measured using portable meters (WTW, Germany), and standard operating procedures were followed to determine the concentrations of orthophosphates (PO_4 ; NF EN ISO 6878), nitrates (NO_3 ; NF EN ISO 10304), nitrites (NO_2 ; NF EN 26777), ammonium (NH_4 ; NF T 90-015-2), silicium dioxide (SiO_2 ; NF T 90-007) and dissolved organic carbon (DOC; NF EN 1484). Water temperature was measured every hour with data loggers (HOBO® Pendant Temperature/Light, Prosensor).

2.2.2. Periphyton characterization

Periphyton was carefully scraped from the slides with a razor blade and suspended in mineral water (Volvic, France, diluted 1:10 with Milli-Q ultra-pure water; Millipore). Total chlorophyll *a* (Chl *a*) and relative distribution of diatoms, chlorophyceae and cyanobacteria were determined by multi-wavelength pulse-amplitude-modulated (PAM) fluorometry on a Phyto-PAM system (H. Walz) as described in Schmitt-Jansen and Altenburger (2008). Photosynthetic efficiency was estimated using the saturation pulse method on the Phyto-PAM fluorometer to determine PSII quantum yield. Diatom samples were prepared every two weeks and taxonomic identification was performed to EU standard NF EN 13946. About 400 frustules were counted per slide at 1000× magnification, and diatoms were identified to the lowest taxonomic level possible using standard references (Krammer and Lange-Bertalot, 1986–1991) and recent nomenclature updates.

2.2.3. Analysis of copper in water and in periphyton

From week 2 to week 6, total dissolved Cu concentrations in control and Cu microcosms were controlled weekly, before and after water change, using the following procedure. Channel water (30 mL) was sampled, filtered (0.45 μm polyvinylidene difluoride [PVDF], Whatman), acidified to 0.5% (v/v) of nitric acid (14M Suprapur, Merck), and stored at 4°C until analysis. Cu concentrations in control and Cu-exposed periphyton were determined at week 6 as described in Tlili *et al.* (2010). Briefly, periphyton was scraped from glass substrates and the suspension obtained was divided into two 20 mL fractions treated or not with 320 μL EDTA (0.25 M) to quantify “internalized” and total Cu in periphyton, respectively. The periphyton suspensions were filtered (0.45 μm , PVDF, Millipore) and dried for 48 h at 50°C. For each sample, at least 5 mg of dried periphyton suspension are required to accurately measure accumulated Cu concentrations. Dried samples were digested with 3 mL of concentrated nitric acid (14M, Suprapur, Merck), and ultra-pure water (Milli-Q, Millipore) was added to dilute the acid concentrate to 0.5% (v/v) before analysis. Total dissolved Cu samples and periphyton extracts were analyzed using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS X Series II, Thermo Electron). Quality controls were routinely checked using certified reference materials (Environment Canada, TM 27-3, Lake Ontario natural water; IRMM, BCR 414, plankton).

2.2.4. Data processing

Variations in biofilm characteristics (chl *a*, PSII yield) among Cu exposures, thermal conditions and sampling dates were tested using 3-way repeated measures ANOVA followed by a *post hoc* Tukey test in R version 2.15.0 (R Development Core Team 2012). Data were log-transformed before statistical analysis to satisfy the assumption of normality and homogeneity of variances.

Structural data, including diatom taxonomic analysis, were compared by non-metric multidimensional scaling (NMDS) using the matrix obtained from relative abundance analysis. Comparison of diatom communities was done by considering only the species representing more than 1% relative abundance in at least one sample. NMDS was performed on the community distance matrix based on Bray-Curtis dissimilarity index using the vegan package (Oksanen *et al.* 2013). The significance of differences in diatom community assemblage structure among treatments and temperatures was tested using a two-way non-

parametric multivariate ANOVA (PERMANOVA) implemented in the PERMANOVA6 software (Anderson, 2001).

2.3. Results

2.3.1. Physico-chemical data

Water temperatures in the four thermal conditions were close to target temperature (i.e. 8, 13, 18 and 23°C) with measured mean values of 8.1 (± 0.7), 12.8 (± 0.7), 18.4 (± 0.4) and 22.9°C (± 0.3), respectively. Table III.1. reports mean values of the main physical-chemical variables measured in the microcosms before and after each water renewal. Statistical analysis revealed no significant differences ($p > 0.05$) between treatments (i.e. no effect of temperature nor Cu), whatever the parameter studied. However, conductivity, nitrates and silica increased slightly with increasing temperatures, while dissolved oxygen concentrations were lower at higher temperatures.

2.3.2. Copper exposure

In control microcosms (i.e. without Cu addition), dissolved Cu concentrations remained very low (0.2–2.2 $\mu\text{g/L}$) throughout the experiment (Fig III.1.). For all Cu microcosms, at two hours after water renewal, mean dissolved Cu concentrations were $13.2 \pm 5.5 \mu\text{g L}^{-1}$, without significant difference between temperatures. Cu concentrations decreased strongly between each water renewal and reached $6.3 \pm 3.7 \mu\text{g L}^{-1}$ just before renewal.

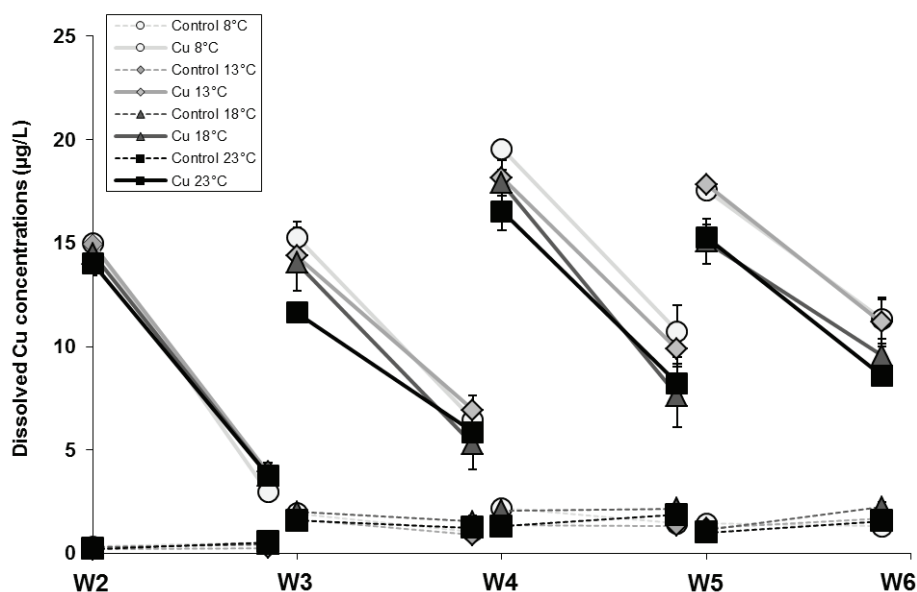


Figure III.1. Mean dissolved Cu concentrations ($\mu\text{g L}^{-1}$) measured in each control and Cu microcosm between week 2 and week 6. Dotted and full lines indicate the time-course of concentrations between each water renewal.

2.3.3. Algal biomass

In control microcosms, chl *a* concentrations increased for all temperatures during 6 weeks (Fig III.2.) without significant difference between temperatures ($p > 0.05$). At the lower three temperatures (i.e. 8, 13 and 18°C), chl *a* concentrations in Cu microcosms were significantly lower than in controls at week 5 and 6 ($p < 0.05$; Fig III.2A., III.2B., III.2C.). The same trend was observed at 23°C, but the Cu effect was transient and was only significant at week 5 (Fig III.2D.).

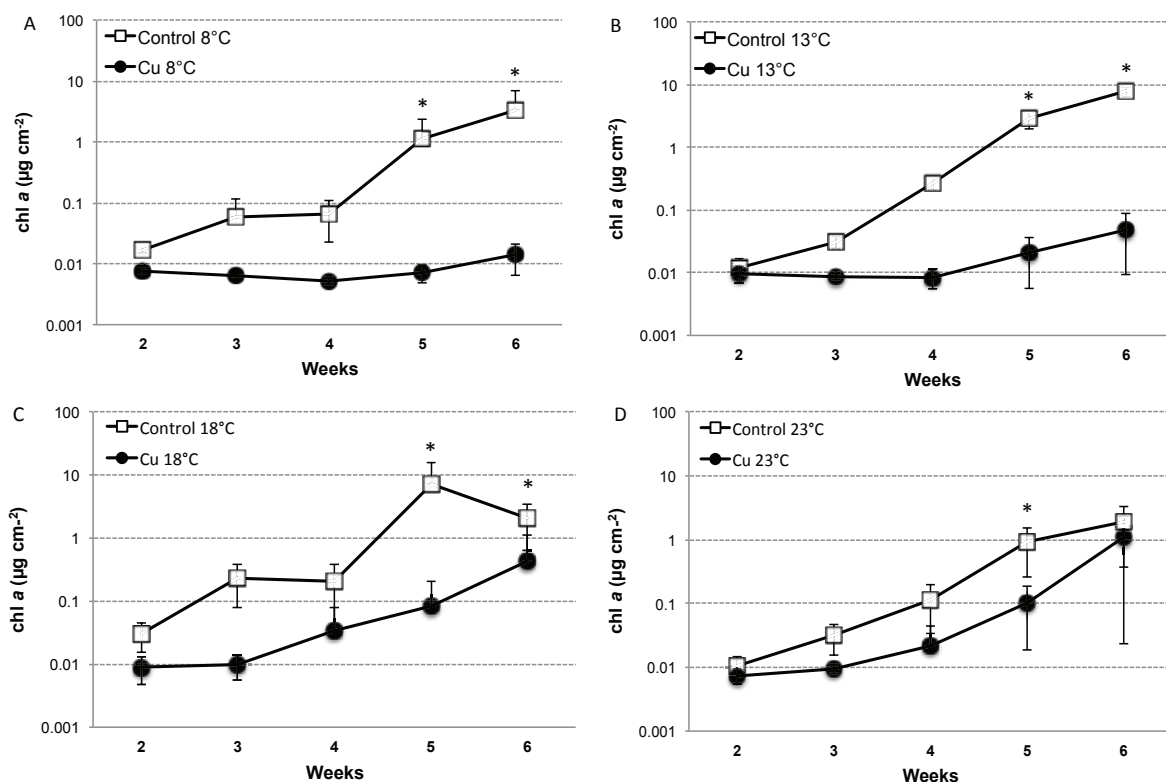


Figure III.2. Time-course of concentrations (mean \pm s.d ; n=3) of chlorophyll a (chl a, $\mu\text{g cm}^{-2}$) between week 2 and week 6 in control and Cu microcosms incubated at 8°C (A), 13°C (B), 18°C (C) and 23°C (D). Asterisks indicate significant differences between treatments (ANOVA, $p < 0.05$).

2.3.4. Algal class composition

For all temperatures, control communities were mostly composed of diatoms and cyanobacteria throughout the experiment (Table III.2.), without significant difference between temperatures ($p < 0.05$). Control communities were also most certainly composed of green algae, however they were not detected by the Phyto-PAM fluorometer, because of their very low abundances. Under these non-exposed conditions, diatoms were strongly predominant, with mean proportion increasing from week 2 (about 70%) to week 6 (76–96% according to temperature) at the expense of cyanobacteria which represented 4–24% of the community according to sampling time and temperature.

At week 2 and week 4, Cu-exposed communities were composed of diatoms, cyanobacteria and green algae, with marked differences between temperatures as green algae proportions were higher at lower temperatures. At week 2, green algae proportions reached $41 \pm 10\%$ at 8°C (Table 2) but only $1 \pm 1\%$ at 23°C (Table III.2.), with significant differences between 8°C and the other temperatures ($p < 0.05$). In contrast, diatom proportions were lower at lower temperatures and at week 2 had reached $42 \pm 8\%$ at 8°C and $74 \pm 2\%$ at 23°C, with significant

differences between 8°C and 18–23°C, and between 23°C and 13–18°C ($p<0.05$). Whereas proportions of cyanobacteria remained relatively stable during the time in Cu microcosms ($21 \pm 3\%$), proportions of green algae and diatoms decreased and increased, respectively, between week 2 and week 6. Thus, at week 6, green algae had almost disappeared whereas proportion of diatoms reached more than 76% whatever the temperature. Accordingly, for each temperature, the distribution of algal classes at the end of the experiment was similar between control and Cu microcosms.

	Cyanobacteria (%)		Green Algae (%)		Diatoms (%)		
	Control (n=3)	Cu (n=3)	Control (n=3)	Cu (n=3)	Control (n=3)	Cu (n=3)	
8°C	week 2	28 ±1	17±2 *	0 ±0	41 ±10 *	72 ±1	42 ±8 *
	week 4	14 ±2	19 ±3	0 ±0	16 ±7	86 ±2	65 ±4
	week 6	4 ±1	19 ±2	0 ±0	1 ±1	96 ±1	80 ±2
	week 2	31 ±3	23 ±3	0 ±0	16 ±14	69 ±3	61 ±11
	week 4	11 ±5	22 ±2	0 ±0	17 ±16	89 ±5	61 ±15 *
	week 6	6 ±3	19 ±2	0 ±0	0 ±0	94 ±3	81 ±2 *
13°C	week 2	24 ±3	20 ±3	0 ±0	8 ±13	76 ±3	73 ±14
	week 4	24 ±6	21 ±3	0 ±0	6 ±5	76 ±6	73 ±9
	week 6	24 ±9	24 ±15	0 ±0	0 ±0	76 ±9	76 ±15
	week 2	31 ±3	26 ±2	0 ±0	1 ±1	69 ±3	74 ±2 *
	week 4	19 ±7	24 ±1	0 ±0	8 ±8	81 ±7	68 ±8
	week 6	17 ±10	20 ±12	0 ±0	0 ±0	83 ±10	80 ±12
18°C	week 2	24 ±3	20 ±3	0 ±0	8 ±13	76 ±3	73 ±14
	week 4	24 ±6	21 ±3	0 ±0	6 ±5	76 ±6	73 ±9
	week 6	24 ±9	24 ±15	0 ±0	0 ±0	76 ±9	76 ±15
	week 2	31 ±3	26 ±2	0 ±0	1 ±1	69 ±3	74 ±2 *
	week 4	19 ±7	24 ±1	0 ±0	8 ±8	81 ±7	68 ±8
	week 6	17 ±10	20 ±12	0 ±0	0 ±0	83 ±10	80 ±12
23°C	week 2	24 ±3	20 ±3	0 ±0	8 ±13	76 ±3	73 ±14
	week 4	24 ±6	21 ±3	0 ±0	6 ±5	76 ±6	73 ±9
	week 6	24 ±9	24 ±15	0 ±0	0 ±0	76 ±9	76 ±15
	week 2	31 ±3	26 ±2	0 ±0	1 ±1	69 ±3	74 ±2 *
	week 4	19 ±7	24 ±1	0 ±0	8 ±8	81 ±7	68 ±8
	week 6	17 ±10	20 ±12	0 ±0	0 ±0	83 ±10	80 ±12

Table. III.2. Time-course of the distribution of different algal classes (cyanobacteria, green algae and diatoms) between week 2 and week 6 in control and Cu microcosms incubated at 8°C, 13°C, 18°C and 23°C. Data are expressed as % of total algal community (mean ±sd ; n=3). For a given algal class, temperature and sampling time, (*) indicate significant differences (ANOVA, *p*≤0.05) between control and Cu exposure communities.

2.3.5. Diatom assemblage structure

Diatoms were the dominant phototrophic component over the experiment. NMDS analysis (Fig III.3.) was used to describe major patterns in the taxonomic composition of diatom communities at the end of the experiment (week 6) when the biofilm was close to the maturity stage (especially in control microcosm, as illustrated by algal growth curves in Fig. 2). We observed that temperature had a strong effect on control diatom assemblage structure. In fact, at 23°C, control communities were characterized by high abundance of *Achnanthes exiguum* (Grunow) Czarnecki (about 20% vs <1% at 8°C) which developed, at the expense of *Planothidium lanceolatum* (Brébisson ex Kützinger) Lange-Bertalot, which had higher abundance at lower temperature (about 61% at 8°C and 42% at 23°C) (see supplementary data). In this way, control diatom assemblages growing at 8°C were significantly different to control diatom assemblages growing at 23°C (PERMANOVA, $p < 0.01$). We also observed strong Cu effects on diatom assemblage structure at 8°C, with significant differences between Cu and control diatom assemblages (PERMANOVA, $p < 0.01$). Indeed, at 8°C, Cu communities were characterized by higher abundances of *Achnanthes exiguum* (about 24% vs <1% in control communities) at the expense of *Planothidium lanceolatum*, which had higher abundance in control communities (about 61% in control and 25% in Cu communities) (see supplementary data). However, Cu effects on diatom assemblage structure were not observed when temperature increased, according to the absence of significant differences between control and Cu diatom assemblages at 13, 18 and 23°C (PERMANOVA, $p > 0.01$).

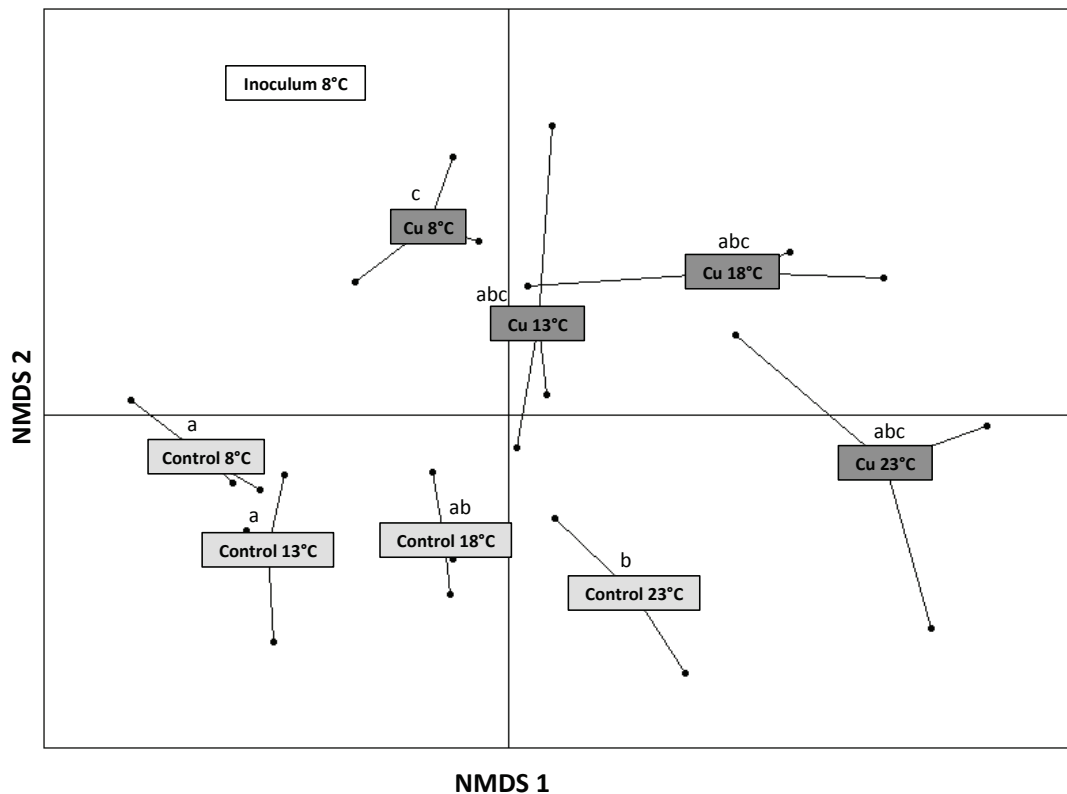


Figure III.3. Two-dimensional plot of the non-metric multidimensional analysis using diatom assemblage composition (microscopic taxonomic identification) in the different microcosms at week 6 for control and Cu communities. Rectangles represent the centre of gravity of control, Cu and inoculum replicates, and lines show measures of dispersion ($n = 3$, except for the inoculum, sampled in one replicat). Different lowercase letters indicate significant differences (PERMANOVA, $p < 0.01$) between treatments (exposure and thermal contexts).

2.3.6. Photosynthetic efficiency

In control microcosms, photosynthetic efficiency increased throughout the 6 weeks of the experiment (Fig III.4.) without significant difference between temperatures ($p < 0.05$). At 8°C, photosynthetic efficiency was significantly lower in Cu microcosms than controls from week 4 ($p < 0.05$). The same trend was observed at 13°C and 18°C but without significant difference between Cu and control microcosms at any point in the experiment. At 23°C, the trend, although not significant, was reversed, with photosynthetic efficiency values slightly higher in Cu microcosms, especially at week 3 and week 4.

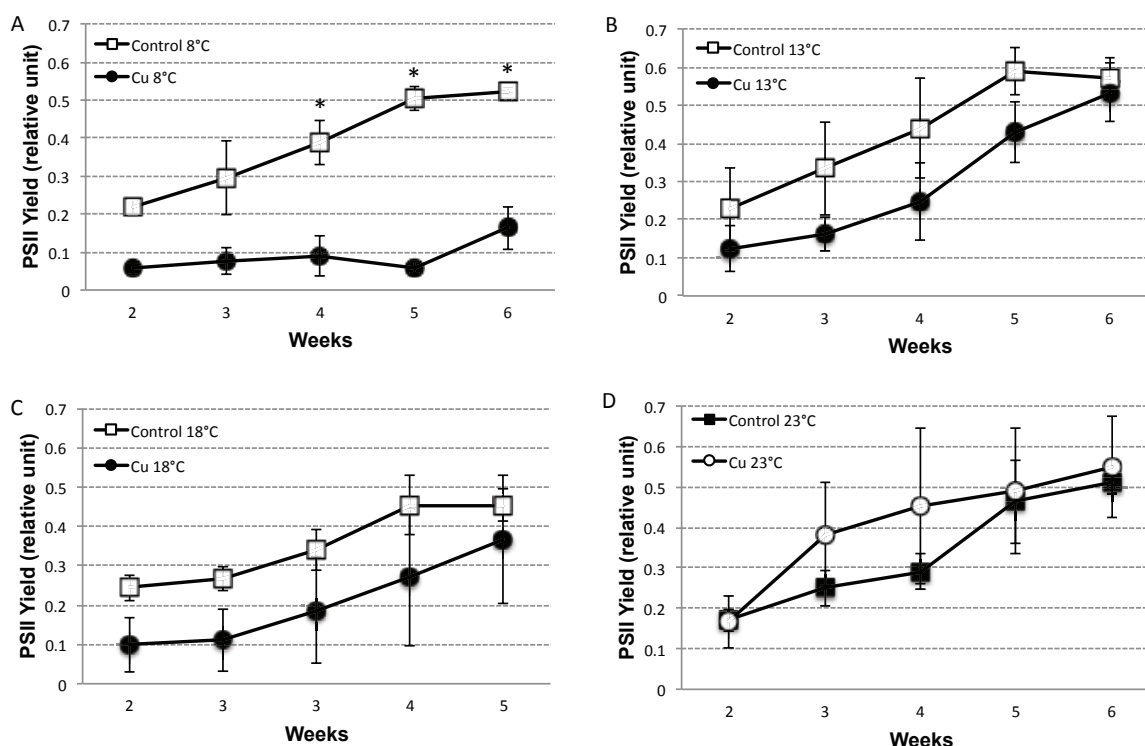


Figure III.4. Time-course of PSII yield (mean \pm s.d. in relative units ; $n=3$) between week 2 and week 6 in control and Cu microcosms incubated at 8°C (A), 13°C (B), 18°C (C) and 23°C (D). Asterisks indicate significant differences between treatments (ANOVA, $p < 0.05$).

2.3.7. Copper bioaccumulation

In control conditions, total Cu concentrations in periphyton were under $132 \pm 48 \mu\text{g Cu g DW}^{-1}$ at the end of the experiment (data not shown). In Cu conditions, total Cu concentrations in periphyton averaged $3276 \pm 646 \mu\text{g Cu g DW}^{-1}$ at 8 and 13°C vs $1584 \pm 275 \mu\text{g Cu g DW}^{-1}$ at 18 and 23°C, with significant differences between 8–13°C and 18–23°C ($p < 0.05$) (Fig III.5.). Furthermore, externalized Cu concentration was 2.5-fold higher at 8 and 13°C (mean: $2359 \pm 531 \mu\text{g Cu g}^{-1} \text{DW}$) than at 18 and 23°C (mean: $974 \pm 236 \mu\text{g Cu g}^{-1} \text{DW}$) ($p < 0.05$). Internalized Cu concentration was 1.5-fold higher at 8 and 13°C (mean: $917 \pm 121 \mu\text{g Cu g}^{-1} \text{DW}$) than at 18 and 23°C (mean: $611 \pm 82 \mu\text{g Cu g}^{-1} \text{DW}$) ($p < 0.05$). Internalized Cu fraction thus represented about 30% and 40% of total Cu fraction at 8–13°C and 18–23°C respectively.

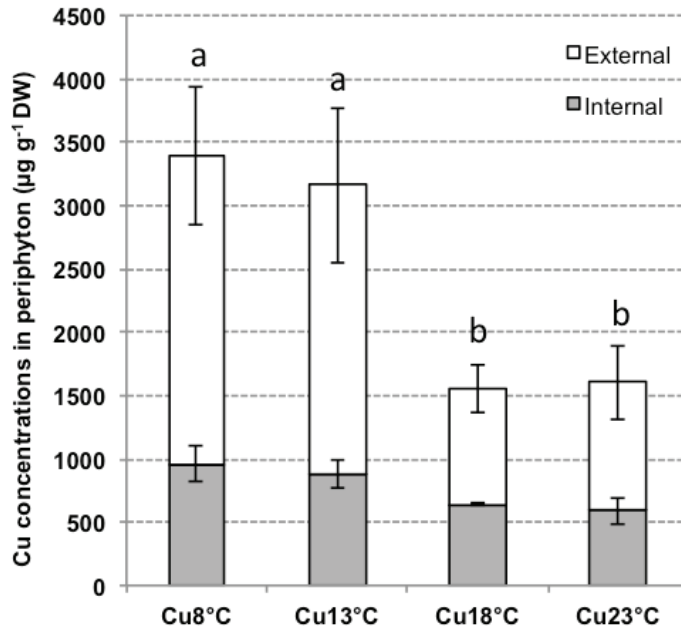


Figure III.5. Mean (\pm sd ; n=3) externalized extracellular and internalized intracellular Cu concentrations in periphyton ($\mu\text{g g}^{-1}$ dry weight) at week 6 in the 4 Cu microcosms incubated at 8°C, 13°C, 18°C and 23°C. Different lowercase letters indicate significant differences (ANOVA, $p < 0.05$) between treatments.

2.4. Discussion

2.4.1. Individual effects of temperature and copper on phototrophic periphyton

Temperature had no significant effect on the growth of periphyton non-exposed to Cu. Previous studies reported various effects of temperature on the growth of phototrophic periphyton. For example, Diaz Villanueva *et al.* (2011) observed no effect of a 3°C temperature rise (from 13°C to 16°C) on final biomass of phototrophic periphyton, but found that periphyton formation was faster at higher temperature. Additionally, Di Pippo *et al.* (2012) found that the exponential phase was delayed in periphyton put through a temperature shift from 20°C to 30°C under non-limiting light and nutrient conditions, which thus suggests that an excessively sharp rise in temperature can slow algal growth. However, they finally observed that the temperature rise promoted ultimately greater biomass production. Temperature also had no effect on global phototrophic community structure in control microcosms. Control communities were dominated by diatoms, which increased over the experiment at all temperatures tested. However, taxonomic analysis revealed a shift in diatom assemblage composition with increasing temperature, as previously shown (Blanchard *et al.* 1996; Blinn *et al.* 1989). According to Dallas (2008), the degree of change in algal community composition with change in temperature can depend on initial ambient

temperature. In our study, increasing temperatures selected for *Achnanthes exiguum*, which has known preferences for warm waters (Owen *et al.* 2008). Besides a change in diatom assemblage structure with temperature, the increase in photosynthetic yield over the course of the experiment was similar between all temperatures tested, as observed for algal biomass.

To specifically evaluate the effects of Cu exposure without considering temperature effects, we assessed the response of phototrophic communities to Cu at 8°C, which matched the *in situ* water temperature at initial sampling in Morcille River. In Cu microcosms regulated at 8°C (and more generally for all temperatures), dissolved Cu concentrations were in the range of those frequently detected in the downstream section of this river during peak contamination periods (Montuelle *et al.* 2010). After each water renewal, dissolved Cu decreased, reflecting Cu uptake by biofilms, as widely reported (e.g. Boivin *et al.* 2007; Knauer *et al.* 1997; Lambert *et al.* 2012). Cu uptake reflected the balance between the Cu concentration in periphyton and the Cu concentration in dissolved phase, that happened in closed experimental systems, as previously reported by Kottelat *et al.* (2010). Total Cu bioaccumulation reached a concentration of $3392 \pm 690 \mu\text{g Cu g}^{-1} \text{DW}$ at the end of experiment (week 6), pointing to a high metal accumulation capacity, especially in comparison with previous studies (Morin *et al.* 2008; Serra and Guasch, 2009; Tlili *et al.* 2011). Furthermore, internalized Cu fraction was about $\frac{1}{3}$ of total fraction ($956 \pm 143 \mu\text{g Cu g}^{-1} \text{DW}$), revealing high periphyton exposure to Cu.

Accordingly, Cu exposure strongly reduced algal biomass and triggered a marked shift in the algal community structure, as previously shown (e.g. Atazadeh *et al.* 2009; Guasch *et al.* 2002; Lambert *et al.* 2012; Serra and Guasch, 2009). Here, these changes led to a transient but significant increase in green algae and a decrease in diatom proportions, while no change was observed in the proportion of cyanobacteria. The greater tolerance of green algae to Cu is consistent with the findings of Serra and Guasch (2009).

2.4.2. Influence of temperature on phototrophic periphyton response to copper

Temperature increase from 8 to 23°C reduced structural and functional effects of Cu on phototrophic periphyton. In fact, while Cu exposure inhibited photosynthetic activity and algal growth at 8°C, this negative effect was suppressed when temperature increased. These results were consistent with the study of Alsterberg and Sundbäck (2013) that showed the absence of effect of Cu pyrithione (antifouling substance) on primary production of benthic microalgae with a +4°C temperature rise (initial temperatures tested being comprised between

9 and 16°C), whereas this activity was significantly reduced by this toxicant at the initial temperature (i.e. without thermal stress). Furthermore, in our study, the increase of temperature under Cu exposure promoted the development of diatom assemblages to the detriment of green algae, these latter being more temperature rise-sensitive (Table III.2.). At species level, Oukarroum *et al.* (2012) observed a combined effect of temperature increase (from 24 to 31°C) and Cu exposure, which reduced the photosynthetic performance of the green algae *Chlorella vulgaris*. These differences in (i) species sensitivity and response to environmental stressors and (ii) changing interactions between algal groups (Crain *et al.* 2008) reinforce the need to directly assess interactive effects of multiple stressors at community level (Moe *et al.* 2013). It further confirms that species-level data may have limited utility for the prediction of community response to multiple stressors (Fischer *et al.* 2013).

Two main hypotheses may explain the reduction of negative effects of Cu on phototrophic periphyton with increasing temperature. The first hypothesis would be the reduction of periphyton sensitivity to Cu, thanks to a co-tolerance between temperature and Cu. It would mean that thermal stress-tolerant species would also be more Cu-tolerant. In our experimental conditions, the temperature increase selected for *Achnanthes* *exiguum* (Grunow) (Czarnecki, 1994) (see supplementary data). This is in accordance with Blinn *et al.* (1989) who also observed an increase in the proportion of *Achnanthes* sp. with temperature. The assumption of a higher Cu-tolerance level for this species, according to the proposed co-tolerance hypothesis, can be supported by studies of Morin *et al.* (2012) and Soldo and Behra (2000) who observed, in Cu exposure context, a change in diatom assemblages leading to a selection of species less sensitive to Cu exposure, including *Achnanthes* sp. This could explain the convergence of control and Cu diatom assemblages with temperature increase observed via NMDS analyses, suggesting that temperature was the most important driver of change in diatom assemblage structure in our experimental conditions. Furthermore it would also be consistent with Boivin *et al.* (2005) who observed that periphytic bacterial communities from periphyton became more tolerant to Cu at 20°C than at 10°C or 14°C.

Another hypothesis for the reduction of Cu effects on periphyton with increasing temperature would be the modification of Cu bioavailability. Indeed, we measured significantly lower total Cu concentrations in periphyton at higher temperatures (18 and 23°C vs 8 and 13°C), in contrast to Boivin *et al.* (2005) who did not find any difference in Cu accumulation in periphyton incubated at various temperatures (between 10 and 20°C). This reduction of Cu bioaccumulation was not due to a limitation of dissolved Cu concentrations,

which were similar whatever the temperature tested (Fig III.1.). Between-temperature differences of Cu concentrations in periphyton could also indicate a change in Cu speciation/complexation in the dissolved phase. The behavior of Cu in the aquatic environment and its toxicity to organisms are highly dependent on the physical-chemical conditions of the water (Roussel *et al.* 2007; Town and Filella, 2000). Copper speciation is known to be particularly controlled by pH and organic matter which will strongly influence its bioavailability, Cu uptake being usually correlated to the free cupric ion (Campbell, 1995). In our experiment, pH and DOC concentrations remained constant and similar in all treatments (Table III.1.). The assessment of Cu speciation was not performed during this study. However, this question was addressed later in another experiment, during which the influence of temperature increase on Cu lability was evaluated using the Diffusive Gradient in Thin film method (DGT method) (Lambert unpublished data). Such approach allowed us to observe that only 10-15 % of total dissolved Cu concentrations were labile; the last 80-85% being adsorbed to organic material. Furthermore, we did not observed difference in Cu lability between temperatures. Thus it could be interesting to assess the possible influence of the quality and the quantity of organic matter. In this present experiment, Cu speciation could have been indirectly modified when temperature increased. In fact, changes in Cu speciation could be due to a production of algal exudates with a different composition with increasing temperatures, allowing Cu complexation with these organic ligands, without significant increase in DOC concentrations.

Changes in Cu accumulation at higher temperatures could also be linked to a more developed matrix of extracellular polymeric substances (EPS). Periphyton produces EPS which allow the initial attachment of cells to different substrata and protect against dehydration and environmental stress (Vu *et al.* 2009) such as metallic contamination. Indeed, EPS have high metal ion adsorption capacity (Lau *et al.* 2005; Loaec *et al.* 1997; Ozdemir *et al.* 2003), thus preventing the diffusion of Cu to deeper layers of the periphyton (Atazadeh *et al.* 2009; Rose and Cushing, 1970). Here, the lower total and internalized Cu concentrations observed in periphyton at higher temperatures may be explained by higher EPS production by the periphyton which could limit the penetration of Cu. This hypothesis is supported by the findings of Di Pippo *et al.* (2012) who observed that higher temperatures, as well as higher light intensities, can favor higher periphyton biomass following an increase in EPS production. Furthermore, García-Meza *et al.* (2005) showed that EPS production increases strongly in Cu-exposed periphyton and Guasch *et al.* (2003) noted that the high resistance of periphyton to metals may be independent of species composition and related more to its

physical structure. In our experiment, both Cu exposure and temperature increase may have strongly promoted EPS production. However, EPS development could not totally explain the decrease in the internal fraction of bioaccumulated Cu since we didn't measure higher external Cu concentrations in periphyton at higher temperatures. Consequently, this modification in Cu bioaccumulation could not solely reflect Cu trapping by EPS matrix.

Furthermore, according to Lambert *et al.* (2014), algal biomass is a good proxy of total periphyton biomass. Atazadeh *et al.* (2009) also found a positive relationship between dry mass of periphyton, and biovolume and chl *a* concentration of algae. Thus, since dissolved Cu exposure was the same for all treatments, lower Cu concentrations measured in periphyton at higher temperatures were possibly explained by a dilution effect of the biomass, which strongly increased with the temperature under Cu exposure (Fig III.2.). Consequently, biodilution and algal exudate production most probably exist but were difficult to differentiate here based on our results.

2.5. Conclusion

This study highlighted that temperature increase modulates river phototrophic periphyton response to chronic Cu exposure. In fact, temperature increase was found to modify Cu response antagonistically, i.e. temperature increase alleviated the negative effect of Cu exposure. This change in phototrophic community response to Cu with increasing temperature likely resulted from a decrease in accumulated Cu concentrations in the periphyton. This reduction in Cu accumulation at higher temperatures seemed to be mainly linked to a biodilution of Cu in the periphyton biomass and/or algal exudate production which could also protect periphyton from Cu accumulation. Other than the reduction in Cu accumulation, our results also suggest that the increase in temperature could have selected for more Cu-tolerant species, with a possible co-tolerance phenomenon between temperature and Cu. To explore this hypothesis further, it would be interesting to use PICT approaches to assess the influence of temperature on the acquisition of Cu tolerance.

Acknowledgments The authors thank Bernard Motte, Christophe Rosy, Bernadette Volat and the staff of the Aquatic Chemistry Laboratory (LAMA) for providing the Irstea with technical support, and ATT for proofing the manuscript language. This work was supported by the LTER Zone Atelier du Bassin du Rhône (ZABR).

Supplementary data

	t0	Week 6							
	8°C	8°C		13°C		18°C		23°C	
	Inoculum	Control	Cu	Control	Cu	Control	Cu	Control	Cu
ACOP	3.5	0.0 ±0.0	1.1 ±0.2	0.0 ±0.0	0.3 ±0.5	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	0.3 ±0.4	0.1 ±0.9
ADEG	0.5	0.5 ±0.5	23.7 ±10.2	0.1 ±0.6	18.2 ±3.6	7.1 ±4.3	68.5 ±38.0	19.7 ±9.0	73.9 ±18.4
ADMI	8.7	9.4 ±5.3	13.3 ±6.0	6.4 ±3.1	7.1 ±0.6	5.0 ±2.1	3.4 ±3.6	15.7 ±2.9	3.7 ±2.8
APED	10.4	1.3 ±0.3	2.3 ±0.4	1.3 ±0.4	0.8 ±0.8	1.4 ±1.6	1.2 ±1.8	0.3 ±0.4	0.3 ±0.3
CPLA	16.9	0.1 ±0.1	7.5 ±2.1	0.2 ±0.2	2.4 ±1.7	0.1 ±0.2	2.7 ±4.2	0.1 ±0.1	0.5 ±0.9
CEUG	1.2	0.4 ±0.7	0.2 ±0.4	0.3 ±0.3	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	0.1 ±0.2	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0
EOMI	3.0	0.9 ±0.8	6.5 ±1.7	2.7 ±1.0	14.5 ±6.3	14.4 ±2.9	5.3 ±5.3	14.6 ±3.0	4.8 ±2.5
FCAP	0.0	0.9 ±1.1	1.2 ±0.6	1.3 ±1.1	0.3 ±0.3	0.1 ±0.2	0.0 ±0.0	1.0 ±1.3	2.5 ±4.4
GPAR	1.0	0.9 ±0.3	1.7 ±1.4	1.4 ±1.1	0.7 ±0.8	0.7 ±0.3	0.4 ±0.2	0.7 ±0.5	1.4 ±0.6
NGRE	1.2	5.9 ±0.5	0.7 ±0.4	3.8 ±0.6	0.3 ±0.5	1.8 ±1.4	0.1 ±0.2	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0
NIFR	1.5	1.1 ±0.3	0.3 ±0.3	0.2 ±0.3	0.2 ±0.8	0.2 ±0.2	0.4 ±0.5	0.2 ±0.3	0.0 ±0.0
NINC	2.0	1.2 ±0.8	0.7 ±0.5	0.3 ±0.3	0.3 ±0.5	0.2 ±0.4	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0
NLIN	1.2	6.4 ±3.4	1.6 ±2.3	2.6 ±0.8	0.2 ±0.4	0.4 ±0.3	0.1 ±0.2	0.0 ±0.0	0.1 ±0.2
NLAN	6.0	0.1 ±0.1	1.0 ±0.4	0.1 ±0.2	0.2 ±0.4	0.2 ±0.2	0.2 ±0.3	0.0 ±0.0	0.2 ±0.2
NPAL	0.3	1.6 ±0.8	1.1 ±1.3	0.9 ±0.5	0.9 ±0.8	0.4 ±0.1	0.2 ±0.3	0.1 ±0.1	7.5 ±12.2
PTLA	11.9	60.6 ±3.4	24.8 ±6.2	73.0 ±2.4	42.7 ±6.8	55.2 ±7.8	10.7 ±15.5	42.1 ±11.3	3.4 ±5.2
PLFR	4.0	3.13 ±0.5	0.4 ±0.7	2.1 ±1.1	2.2 ±1.5	9.1 ±4.6	3.4 ±4.7	3.1 ±1.3	0.0 ±0.0
RSIN	11.2	0.2 ±0.3	3.7 ±1.8	0.1 ±0.2	1.0 ±1.0	0.0 ±0.0	0.6 ±0.8	0.0 ±0.0	0.2 ±0.2
RABB	6.2	0.0 ±0.0	1.9 ±0.8	0.0 ±0.0	0.9 ±1.1	0.0 ±0.0	0.4 ±0.5	0.0 ±0.0	0.1 ±0.2
SANG	0.0	1.2 ±0.7	0.8 ±1.3	0.6 ±0.5	3.4 ±5.9	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0

Mean values (± sd) of relative abundances of the dominant diatom species (>1% in at least one sample) at t0 in the initial inoculum (n=1) and at week 6 in each treatment (n=3). Data are expressed in % of total diatom assemblage. ACOP, *Amphora copulata*; ADEG, *Achnantheidium exiguum*; ADMI, *Achnantheidium minutissimum*; APED, *Amphora pediculus*; CPLA, *Cocconeis placentula*; CEUG, *Cocconeis euglypta*; EOMI, *Eolimna minima*; FACP, *Fragilaria capucina*; GPAR, *Gomphonema parvulum*; NGRE, *Navicula gregaria*; NIFR, *Nitzschia frustulum*; NINC, *Nitzschia inconspicua*; NLIN, *Nitzschia linearis*; NLAN, *Navicula lanceolata*; NPAL, *Nitzschia palea*; PTLA, *Planothidium lanceolatum*; PLFR, *Planothidium frequentissimum*; RSIN, *Reimeria sinuata*; RABB, *Rhoicosphenia abbreviata*; SANG, *Surirella angusta*.

3. Conclusions

Les résultats obtenus ont montré que l'augmentation de la température (de +5°C à +15°C) a engendré une atténuation des effets du Cu sur les communautés phototrophes des biofilms prélevés en hiver. En effet, nous avons mis en évidence une réduction, voire une absence d'effet du Cu sur leur structure (i.e. biomasse et répartition des classes algales) et leur activité photosynthétique. Ces résultats suggèrent ainsi une interaction antagoniste entre le Cu et la température dans nos conditions expérimentales.

Sur la base des paramètres mesurés, et compte tenu de la diminution de la bioaccumulation du Cu observée en condition de hausse thermique, nous avons pu proposer deux hypothèses pour expliquer cet antagonisme :

- i) L'augmentation de la température a diminué la sensibilité des communautés phototrophes au Cu ;
- ii) L'augmentation de la température a diminué l'exposition des communautés du biofilm au Cu.

i) La première hypothèse est soutenue par les modifications observées au niveau de la structure des assemblages de diatomées, et qui ont mis en évidence que l'augmentation de température engendrait un rapprochement des communautés exposées et non exposées au Cu, sur la base de leur composition taxonomique. Ce constat, associé à une diminution des effets du Cu aux fortes températures, suggère donc que la hausse thermique engendre un recrutement d'espèces diatomiques co-tolérantes à la température et au Cu, même en absence d'exposition à ce métal. Cependant, au cours de cette étude, le lien entre le changement de structure des communautés phototrophes et la diminution de leur sensibilité au Cu n'a pas pu être directement établi, puisque ce niveau de sensibilité n'a pas été évalué. Pour conforter cette hypothèse, il est donc nécessaire de coupler les approches structurales à des approches PICT, qui permettraient de suivre l'évolution des niveaux de tolérance des communautés de biofilm au Cu dans le cadre d'une hausse de la température.

ii) La seconde hypothèse s'appuie sur le constat d'une diminution de la bioaccumulation du Cu avec l'augmentation de la température. Cependant, les mesures effectuées et les résultats obtenus dans cette étude ne permettent pas de comprendre précisément la cause d'une telle diminution. Les principales hypothèses que nous avons

formulées concernant une réduction de la bioaccumulation du fait d'une biodilution du Cu par la biomasse (celle-ci augmentant avec la température) et/ou d'une complexation avec les EPS, présentes sous forme d'exsudats algaux ou de matrice, et qui peuvent être produites dans le cadre de mécanismes de protection au Cu. (voir Chapitre I, § 2.3.3.). Compte tenu du rôle clé de la MO d'origine microbienne dans la spéciation et la biodisponibilité du Cu (voir Chapitre II, § 2.2.), ces hypothèses soulèvent donc un questionnement quant à son influence sur la bioaccumulation du Cu, en fonction du contexte thermique.

Suite à cette première étude, nous avons donc choisi de répondre aux deux grandes hypothèses soulevées, concernant l'influence de la température sur i) la sensibilité et ii) l'exposition des communautés de biofilm au Cu du biofilm. Pour ce faire, nous avons choisi de mettre en œuvre une deuxième expérience, qui visait à évaluer plus spécifiquement l'influence de la température sur i) l'acquisition de tolérance du biofilm au Cu, en lien avec l'évolution de la structure des communautés phototrophes (en particulier de la composition diatomique) et ii) les capacités de la matrice EPS à piéger le Cu. Pour cette étude, nous avons choisi de considérer des communautés prélevées en fin d'été, afin d'appréhender également les possibles variations saisonnières au niveau de la réponse microbienne. Ce travail est décrit dans le chapitre VI du manuscrit.

Cependant, afin de répondre à ces deux objectifs, il s'est avéré nécessaire au préalable de réaliser des développements méthodologiques, afin i) d'optimiser les protocoles des tests de toxicité utilisés dans le cadre de l'approche « PICT » (en particulier lorsque différentes conditions thermiques sont testées), et ii) de mettre en place un protocole d'extraction de la matrice EPS, en vue de mesurer les concentrations en Cu dans cette fraction du biofilm. Ces développements méthodologiques sont présentés dans le chapitre suivant.

Chapitre IV

Développements méthodologiques pour évaluer la sensibilité des communautés phototrophes de biofilms au cuivre

1. Introduction

Une exposition chronique du biofilm au Cu peut induire la sélection d'espèces tolérantes et/ou la mise en œuvre de mécanismes d'adaptation spécifique à ce métal, tels que des processus de détoxification. Il peut ainsi en résulter un accroissement de la tolérance globale de la communauté de biofilm au Cu, conformément au concept « PICT » (Soldo and Behra, 2000; Tlili *et al.* 2010). Pour évaluer cette induction de tolérance, des tests de toxicité à court terme sont réalisés, pour mesurer le niveau de sensibilité de la communauté à une exposition aiguë. Le principe de ces tests de toxicité, utilisés dans le cadre de l'approche « PICT », consiste à exposer une communauté biologique à une gamme de concentrations croissantes en toxique, ce qui permet d'observer l'inhibition à court terme de paramètres mesurés, tels que la photosynthèse, certaines activités enzymatiques ou encore la respiration. La comparaison des courbes doses-réponses obtenues avec les communautés non pré-exposées et celles pré-exposées permet ainsi la détection du PICT (Schmitt-Jansen *et al.* 2008) (voir Chapitre I, § 2.3.2.).

Cependant, il a été démontré que certains paramètres expérimentaux, qui découlent des caractéristiques intrinsèques du biofilm, comme la concentration en suspension de biofilm testée (Soldo and Behra, 2000 ; Fechner *et al.* 2010) ou encore la maturité du biofilm (Duong *et al.* 2010), peuvent modifier les niveaux de tolérance mesurés lors des tests de toxicité aiguë. La littérature fait également apparaître une grande variabilité concernant la durée d'exposition du biofilm lors des tests de toxicité mis en œuvre dans les approches « PICT », y compris pour un même toxique. Ainsi, les durées des expositions aiguës utilisées pour évaluer la tolérance de communautés phototrophes de biofilms au Cu par mesure de l'efficacité photosynthétique fluctuent entre 2 h (Tlili *et al.* 2010), 4 h (Guasch *et al.* 2012) et 6 h (Serra and Guasch, 2009). Cependant, à notre connaissance, l'influence de ce paramètre sur les niveaux de tolérance mesurés n'a jamais été appréhendée. Il en est de même pour la température d'incubation. D'après la littérature, et quel que soit le type d'études (i.e. *in situ* ou en microcosmes de laboratoire), les tests de toxicité aiguë sont généralement réalisés à la température ambiante du laboratoire, qui peut parfois être très éloignée de celle mesurée lors de l'exposition chronique au toxique (Serra and Guasch, 2009; Dorigo *et al.* 2010). Cela pose ainsi la question de l'effet potentiel d'une variation de la température entre le milieu d'exposition et le milieu du test de toxicité, sur la mesure des niveaux de tolérance. C'est

pourquoi dans certaines études, plus rares, les tests de toxicité ont été réalisés à la température de croissance du biofilm (Tlili *et al.* 2010). Cependant, là encore, l'influence des conditions thermiques lors de ces tests n'a jamais été appréhendée à notre connaissance.

Or, dans notre contexte d'étude, qui s'inscrit dans une démarche multistress, nous avons souhaité évaluer spécifiquement l'influence du contexte thermique (i.e. température de croissance) sur les niveaux de tolérance des communautés phototrophes de biofilm au Cu (Chapitre VI), en vue de répondre à notre hypothèse proposée lors de la première expérimentation, qui portait sur l'influence de la température sur la sensibilité du biofilm au Cu (Chapitre III). Afin de répondre à cet objectif, il était donc primordial, au préalable, d'évaluer l'influence des conditions thermiques, appliqués lors des tests de toxicité, sur les niveaux de tolérance, mesurés dans le cadre de l'approche « PICT ». De manière plus générale, la variabilité des protocoles utilisés lors des mesures de niveau de tolérance dans les approches « PICT » soulève une forte interrogation quant à la reproductibilité et la comparabilité des résultats obtenus dans les différentes études mettant en œuvre ce type d'approche. Ainsi, en plus de permettre l'optimisation du protocole des tests de toxicité, utilisés dans les approches « PICT » mises en œuvre dans notre contexte d'étude, nos développements méthodologiques s'inscrivent dans une démarche plus générale répondant au besoin d'une meilleure standardisation de la méthode « PICT », qui a été souligné récemment par un collectif de chercheurs européens (Tlili *et al.* 2015). Il est important de noter que les développements méthodologiques réalisés au cours de ce travail de thèse ont ciblé exclusivement les communautés phototrophes de biofilm, en vue d'évaluer leur sensibilité à une exposition aiguë (i.e. tests de toxicité) au Cu, sur la base de la mesure de l'efficacité photosynthétique (voir Chapitre III).

Ces travaux ont fait l'objet de deux articles (dont un accepté) qui constituent ce chapitre :

i) Le premier, publié dans *Environmental Sciences Pollution Research*, (article 2) décrit une expérience qui visait à évaluer l'influence de la concentration de la suspension de biofilm (i.e. biomasse), la maturité du biofilm et la durée d'exposition, sur la mesure des niveaux de sensibilité au Cu de communautés phototrophes non exposées à ce métal.

Afin de tester l'influence de la concentration en suspension de biofilm, la maturité du biofilm et la durée d'exposition, le développement d'un biofilm, non exposé au Cu, a été réalisé à une température constante identique à la température appliquée lors des tests de toxicité aiguë (i.e.

23°C), afin de s'affranchir de l'influence possible de la température d'incubation sur les niveaux de tolérance mesurés.

Au cours des tests de toxicité, des suspensions de biofilm, de concentrations comprises entre 400 à 7000 $\mu\text{g chl } a \text{ L}^{-1}$, du fait de dilutions successives, ont été exposées à une gamme de 5 concentrations croissantes en Cu (comprises entre 0,32 et 32 mg L^{-1}), pendant 2, 4 et 6 h. Les niveaux de tolérance des communautés phototrophes au Cu ont été mesurés après 3 et 5 semaine de croissance du biofilm. La figure IV.1. présente la stratégie expérimentale mise en place, afin de tester l'influence de ces différents paramètres.

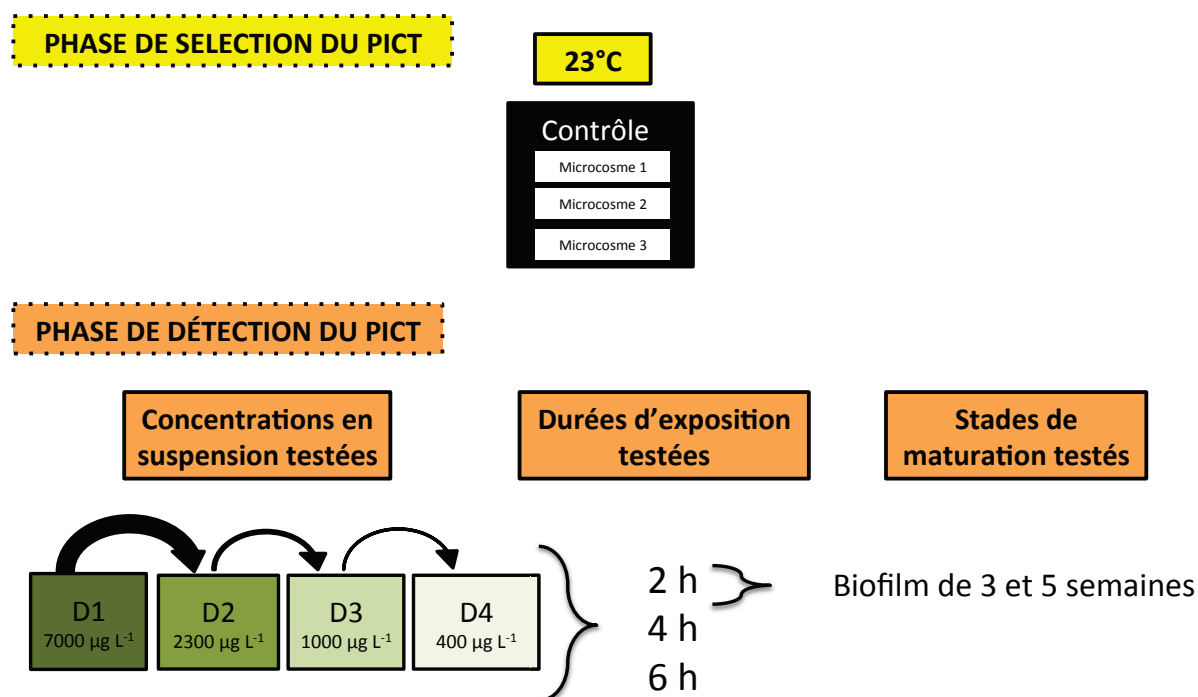


Figure IV.1. Stratégie expérimentale : paramètres testés au cours de la phase de détection de la méthode PICT, réalisée à une température d'incubation de 23°C (article 2). D, dilution de la suspension de biofilm.

ii) Le second article, en préparation pour la revue *Aquatic Toxicology*, (article 3), avait pour objectif principal d'évaluer l'influence de la température d'incubation lors des tests de toxicité aiguë sur la mesure des niveaux de tolérance au Cu de communautés phototrophes, dans le cadre d'une approche « PICT » réalisée sous contrainte thermique. Dans ce contexte d'étude multistress (exposition chronique au Cu et au stress thermique), il est primordial de dissocier les effets thermiques liés à l'exposition aiguë (phase de détection du PICT), des effets thermiques liés à l'exposition chronique (phase de sélection du PICT). Au cours de cette étude, nous avons donc jugé également important d'appréhender l'influence de la

température du milieu d'exposition (i.e. température de croissance) sur la sensibilité des communautés phototrophes de biofilm au Cu.

Le développement d'un biofilm a été réalisé en absence ou en présence d'une forte concentration en Cu ($60 \mu\text{g L}^{-1}$). Ce niveau d'exposition au Cu a été choisi, afin de promouvoir, autant que possible, la sélection d'espèces tolérantes au Cu et induire, ainsi, des changements significatifs dans la composition de la communauté, par rapport à la communauté non exposée au Cu. La figure IV.2. présente la stratégie expérimentale mise en place pour répondre aux objectifs visés. Afin d'étudier l'influence de la température sur l'acquisition de la tolérance au Cu des communautés phototrophes (i.e. température de croissance durant la phase de sélection du PICT), le développement du biofilm a été réalisé à deux températures distinctes, 18 et 28°C. Afin d'étudier l'influence des conditions thermiques sur la mesure des niveaux de tolérance au Cu des communautés phototrophes (i.e. phase de détection du PICT), les tests de toxicité ont été réalisés à différentes températures (i.e. température d'incubation) : à la température de croissance du biofilm (i.e. 18 ou 28°C) et à une température intermédiaire entre les températures de croissance (i.e. 23°C). Les tests de toxicité ont été réalisés, également, à partir d'une concentration en suspension de $2000 \mu\text{g chl } a \text{ L}^{-1}$, exposée à une gamme de 9 concentrations croissantes en Cu (comprise entre 0,32 et 3200 mg L^{-1}) pendant 2 h. Ces paramètres ont été définis à la suite de la première étude (voir conclusion de l'article 2, dans ce chapitre).

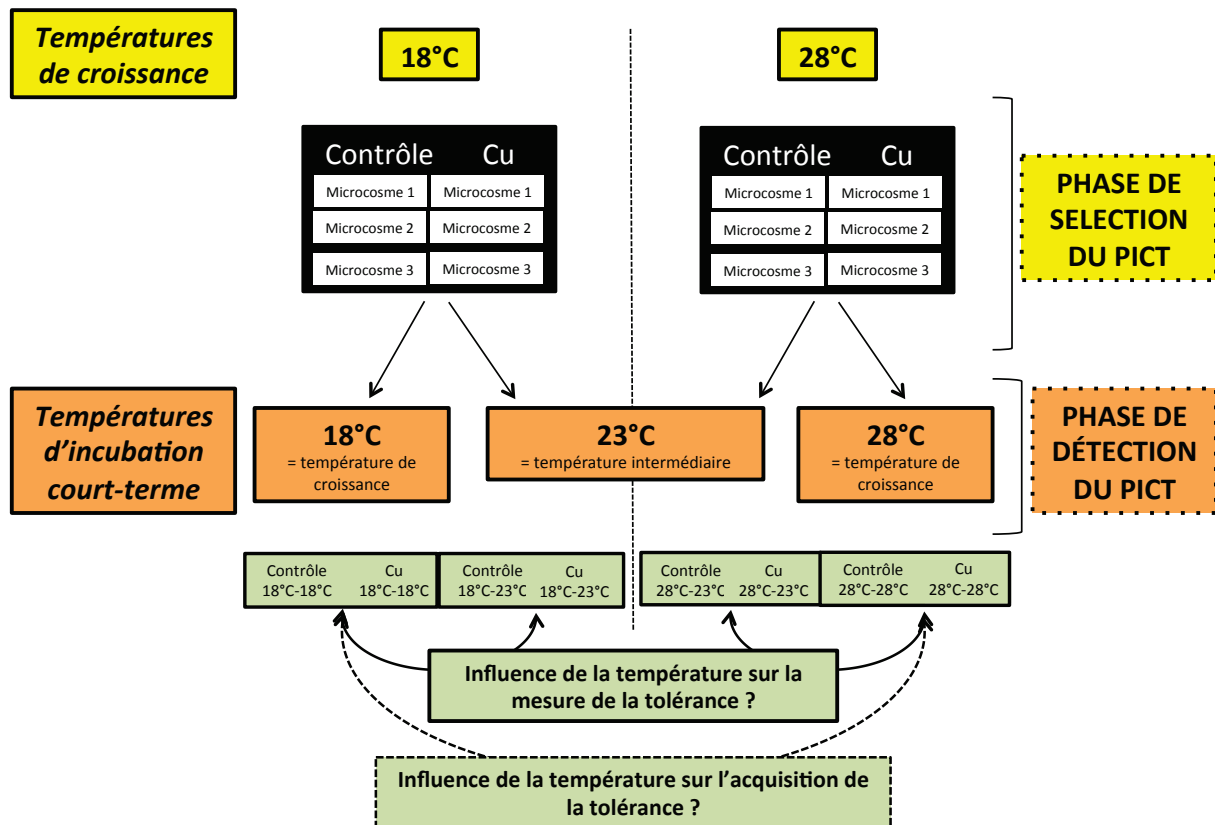


Figure IV.2. Stratégie expérimentale: températures testées au cours des phases de sélection et de détection de la méthode « PICT » (article 3).

2. Improved short-term toxicity test protocol to assess metal tolerance in phototrophic periphyton: Toward standardization of PICT approaches

Environ Sci Pollut Res (2015) 22:4037–4045. DOI 10.1007/s11356-014-3505-4

Anne Sophie Lambert¹; Stéphane Pesce¹; Arnaud Foulquier^{1, 2}; Josiane Gahou¹; Marina Coquery¹; Aymeric Dabrin¹

1. Irstea, UR MALY, centre de Lyon-Villeurbanne, 5 rue de la Doua CS 70077, F-69626 Villeurbanne cedex, France

2. INRA, UMR Carrtel, 75 av. de Corzent, BP 511. FR-74203 Thonon-les-Bains, France

Abstract

Pollution-induced community tolerance (PICT) approaches involve comparing tolerance levels of natural communities to a particular contaminant or a contaminant mixture using short-term toxicity tests performed under controlled conditions. However, results from toxicity tests can be modulated by various environmental and experimental conditions, raising questions about their reproducibility and comparability. In this context, the present study aimed to determine the influence of exposure duration, periphyton suspension concentration and periphyton maturation stage on the measurement of short-term effects of copper on phototrophic periphyton communities. Our results showed the very weak influence of exposure duration in the tested range (2–6 h) on toxicity level, whereas periphyton biomass in the tested suspension (in terms of both chlorophyll *a* concentrations and dry weight), proved a crucial determinant in toxicity assessment. Results also highlighted the potential tolerance increase with the periphyton maturation stage. This parameter conditioned the positive linear relationship between tolerance level and periphyton suspension concentration, leading to an increase in the linear regression slope with the maturation stage. This suggests that such a relationship is probably highly periphyton-dependent. Consequently, to enable data toxicity comparisons, an *a priori* normalization of the periphyton suspension biomass is necessary, and PICT approaches require the use, as much of possible, of periphyton with similar maturation stage. Finally, the present study clearly shows that a better standardization of PICT approaches could help to improve reproducibility. It could thus facilitate the comparison of tolerance levels measured in the same study (e.g. spatial and/or temporal and/or inter-treatment comparison) as well as the comparison obtained from different experimental and *in situ* research.

Keywords: Microbial ecotoxicology; Biofilm; PICT; Short-term toxicity tests; Metal.

2.1. Introduction

The concept of pollution-induced community tolerance (PICT), first introduced by Blanck *et al.* (1988), is an ecotoxicological tool that can help to characterize environmental status, since it takes into account the contamination history of the ecosystem at the community level (Tlili and Montuelle, 2011). PICT is based on the fact that chronic exposure of a biological community to a toxicant will induce a succession of species resulting in a replacement of the sensitive species by more tolerant ones (Blanck, 2002) and/or specific adaptation such as the establishment of mechanisms for detoxification, thus leading to an increased community tolerance to this toxicant (Tlili and Montuelle, 2011). The approach uses the theoretical basis of toxicology (the dose-response model) to quantify community tolerance (Schmitt-Jansen *et al.* 2008), and can give an indication of past *in situ* exposure of the community to toxicants (Tlili and Montuelle, 2011).

In principle, the PICT concept can be applied to terrestrial and aquatic ecosystems (Hjorth *et al.* 2006; Niklinska *et al.* 2006). Although, they can be applied with vertebrates (Knopper and Siciliano, 2002) and invertebrates (Millward and Grant, 2000), PICT approaches are used mainly for microbial communities such as bacteria (Boivin *et al.* 2005) and photosynthetic microorganisms (Dahl and Blanck, 1996). Induced tolerance is observed by comparing the sensitivity of natural communities to a particular contaminant or contaminant mixture (Kim-Tiam *et al.* 2014), using short-term toxicity tests performed under controlled conditions. These tests are based on representative endpoints such as, photosynthetic efficiency (Dorigo *et al.* 2010; Tlili *et al.* 2010), respiration potential (Dorigo *et al.* 2010; Tlili *et al.* 2011) enzymatic activities (Fechner *et al.* 2012), and metabolic capacities (Boivin *et al.* 2005). Different studies have thus highlighted an increased tolerance of microbial communities to various substances such as metals and metalloids, and organic pesticides following chronic exposure to these toxicants in various ecosystems (see for reviews Blanck, 2002; Imfeld and Vuilleumier, 2012; Tlili and Montuelle, 2011). In aquatic environments, metals including copper, zinc, lead, nickel, mercury, and cadmium have been particularly well-studied in PICT approaches, because of their abundance in surface waters and their potential toxicity to aquatic microbial communities (e.g. Gustavson *et al.* 1999; Soldo and Berha, 2000; Barranguet *et al.* 2002; Serra and Guasch, 2009).

In lotic environments, the PICT approach is frequently applied on surface-associated microbial communities, called periphyton (or biofilm). Periphyton is a complex assembly of microbial communities (including microalgae, bacteria, fungi and heterotrophic protists)

embedded in a polysaccharide and protein matrix. Since they are attached to natural surfaces, periphyton integrate the effects of multiple anthropogenic disturbances over extended periods of time, and have strong capacities to adapt to environmental changes (Sabater *et al.* 2007). Tolerance assessment of phototrophic periphyton communities (mainly composed of microalgae and cyanobacteria) is generally performed using photosynthesis as a functional parameter (Dahl and Blanck, 1996; Bérard *et al.* 2003).

However, short-term effects of metals on photosynthesis can be modulated by various environmental and experimental conditions, and protocols used in toxicity test vary widely among studies, sometimes hindering comparison of results (Eklund and Kautsky, 2003). For example, it has been shown that metal effects on microalgae depend not only on metal concentration, but also on cellular densities (Tobar *et al.* 1993). This biological parameter can modulate accumulation of metal on individual cells, thus modulating their exposure level (Stemann and Wium-Andersen, 1970; Moreno-Garrido, 1997). Moreno-Garrido *et al.* (2000) thus observed an increase in copper toxicity (i.e. a decrease in half effective concentration (EC₅₀) values) to marine microalgal species when their initial cellular density decreased. In the same way, Fechner *et al.* (2010) observed for heterotrophic periphyton communities an increase in metals EC₅₀ values concomitantly with an increase in periphyton suspension concentrations (periphyton biomass used during the toxicity test). The literature reveals that exposure durations in toxicity tests with metals can vary widely among studies. For example, in the case of short-term toxicity tests to evaluate effects of copper on photosynthetic efficiency of periphyton, exposure duration (incubation duration) can be 2 h (Tlili *et al.* 2010; Lambert *et al.* 2012), 4 h (Guasch *et al.* 2004) or 6 h (Serra and Guasch, 2009), but the influence of such differences on the obtained results is still sparsely documented. Since these parameters are rarely taken into account (or described) in studies using short-term toxicity tests, prior findings confirm the need for better standardization of toxicity tests for reproducibility and comparability of toxicity data, as previously stated (Soldo and Berha, 2000; Eklund and Kautsky, 2003; Fechner *et al.* 2010). It is now well accepted that PICT can serve as a powerful tool for *in situ* assessment of chronic effects of toxicants on periphyton communities (Pesce *et al.* 2010). This kind of approach raises question about the periphyton sampling procedure, which appears to be highly variable between studies, depending on the use of either natural (Dorigo *et al.* 2010) or artificial substrates, with fluctuating colonization durations (e.g from 2 weeks (Blanck and Dahl, 1996) to 2 months (Pesce *et al.* 2010)). This notably raises the question of the influence of the maturation stage (growth stage) in tolerance assessment. Maturation processes include both species succession, which conditions the

tolerance baseline of the community, and the building of a highly complicated structure that can form a protective layer (Extracellular Polymeric Substances), thereby influencing the level of exposure to toxicants (Ivorra *et al.* 2000; Gold *et al.* 2003a, 2003b).

Given this background, the main aim of our work was to help identify the most important parameters that must be considered to obtain reproducible and comparable results from short-term toxicity tests for metals on natural phototrophic periphyton communities.

Accordingly, we developed a microcosm approach aiming to accurately determine the influence of three main parameters on the significance and reproducibility of results obtained from short-term dose-response relationships for metals (as performed for tolerance determination in the PICT detection step). Copper was chosen as model compound because of its frequent occurrence in freshwater environments (Fechner *et al.* 2012) as well as its current use in PICT approaches. We thus focused on the influence of (i) periphyton suspension concentration, (ii) duration of exposure to copper, and (iii) periphyton maturation stage.

2.2. Materials and Methods

2.2.1. Experimental setup and periphyton sampling procedure

Microcosm experiments were carried out in three independent microcosms (glass, 40 × 20 × 25 cm), incubated in thermoregulated tanks at 23 °C (polyethylene, 250 L, 121 × 81 × 33cm). One submersible pump (New Jet 800) was introduced in each microcosm to reproduce the water flow (water discharge ~1.2 L/min), and three pumps were placed in the tank to homogenize water temperature. High-pressure sodium lamps were used to obtain a constant light intensity of 3500 lux (42.7 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) under a 13 h/11 h light/dark photoperiod. Artificial substrates (glass slides) were previously placed vertically at the surface in each microcosm to allow periphyton settlement. Microcosms were filled with untreated groundwater and a suspension of natural periphyton, collected on stones in April 2013 at the upstream reference site of the Morcille River (Beaujolais, Eastern France) with low Cu concentrations (dissolved concentrations lower than 0.9 $\mu\text{g L}^{-1}$; see Montuelle *et al.* (2010) for details). Silica, nitrates and phosphates were added at concentrations of 15 mg L^{-1} , 8 mg L^{-1} , and 0.2 mg L^{-1} , respectively, to reach sampling site concentrations (Dorigo *et al.* 2010). Water was renewed weekly to avoid nutrient depletion. The experiment lasted 5 weeks. In order to obtain a periphyton suspension for short-term bioassays, two series of samples were taken from the microcosms, after 3 and 5 weeks of colonization, respectively. The periphyton was scraped from glass substrates collected in each microcosm, and suspended in a diluted

equivalent mixture of demineralized water and mineral water (Evian, France) to obtain three replicates of periphyton suspension at $36 \text{ cm}^2 \text{ mL}^{-1}$.

2.2.2. Short-term bioassays

The same medium should be used for all toxicity tests, in order to avoid changes in metal bioavailability during metal toxicity testing (Blanck 2002, Blanck *et al.* 2003). Accordingly and to improve standardization an equivalent mixture of demineralized water and mineral water (Evian, France) was therefore used to prepare periphyton suspensions as well as Cu solutions. A semi-logarithmic series of Cu concentrations was freshly prepared to obtain five Cu concentrations, ranging from about 0.32 to 32 mg L^{-1} . Cu concentrations in each dilution were checked using inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS X Series II, Thermo Electron).

The tolerance of phototrophic periphyton communities to Cu was assessed using photosynthetic efficiency as endpoint. Photosynthetic efficiency is based on the measurement of maximal quantum yield (Y_{II}) of algae (Schreiber *et al.* 2002). It reflects the number of functional photosystems II (PSII), and therefore more generally the physiological state of the phototrophic communities (Tlili *et al.* 2010). To assess this parameter, periphyton suspensions (1.8 mL, see procedure below) were exposed to increasing concentrations of Cu (0.9 mL) in a climatic chamber at 23°C (temperature of microcosms during growth period) (MLR-350 Versatile Environmental Test Chamber, Sanyo) under artificial light (1400 lux). Samples were then kept for 30 min in a dark chamber and PSII quantum yield (665 nm) was determined using a PhytoPAM (pulse amplitude-modulated) fluorometer (Heinz Wals, GmbH). For each sample replicate, four blanks and two analytical replicates were analyzed for each concentration. A single saturation pulse was applied to calculate the maximal quantum yield as $Y_{II, 665 \text{ nm}} = (F_m - F_0)/F_m$, where F_m is the maximum fluorescence after the saturation pulse, and F_0 is the steady state fluorescence.

Three variable parameters were assessed during the short-term toxicity tests: (i) periphyton biomass, (ii) exposure duration, and (ii) maturation stage. Given the predominance of phototrophic microorganisms in illuminated periphyton, we postulated that the estimation of the phototrophic biomass (based on chl *a* concentrations) might give a relative estimation of the total biomass. The influence of periphyton biomass was thus tested using various periphyton suspension concentrations. Successive dilutions of the initial periphyton suspension were performed with the demineralized/mineral water mixture (see above) to

obtain periphyton suspension concentrations ranging from about 400 µg chl *a* L⁻¹ (dilution 4, i.e. D4) to about 7000 µg chl *a* L⁻¹ (D1). These concentrations were estimated from chlorophylla (chl *a*) measurement with the PhytoPAM fluorometer. This relative estimation of periphyton suspension biomass was then checked with 5-week periphyton by measuring total biomass (dry weight, DW) as described in Morin *et al.* (2010).

The influence of the duration of exposure to Cu was evaluated from toxicity tests after 2 h, 4 h and 6 h of incubation. The influence of the periphyton maturation stage was assessed by performing toxicity tests with periphyton retrieved after 3 and 5 weeks of development in the microcosms.

2.2.3. Statistical analysis

The relationship between chl *a* and periphyton DW was assessed using linear regression analysis. The analysis of results from short-term bioassay was conducted using functions from the ‘drc’ package (Ritz and Streibig, 2005) in R version 2.15.0 (R Development Core Team, 2012). Dose-response curves were fitted to the data using the four-parameter log-logistic model given by the formula:

$$response = c + \frac{d - c}{1 + \exp\{b \times (\log(Dose) - \log(e))\}}$$

where *b* denotes the slope of the curve around *e*. Parameters *c* and *d* are the lower and upper limits of the curve, respectively, and *e* denotes the EC₅₀, the dose producing a response half-way between the upper and the lower limit. The response variable was expressed as the percentage of the yield of uncontaminated control assay. In addition, EC₁₀, and EC₅₀ were derived from each dose-response curve. Data from the three replicate bioassays were pooled to produce a single dose-response curve with the % inhibition of PSII activity as a function of Cu concentrations. Student *t* tests were used to determine significant differences in EC_x between treatments using the selectivity index (SI) function from the ‘drc’ package. Linear regression analyses were performed to evaluate the relationship between EC_x and chl*a* concentrations. Analysis of covariance (ANCOVA) was used to determine whether the relationship differed between periphyton maturation stages.

2.3. Results and discussion

2.3.1. Influence of tested parameters

Assessment of short-term toxicity of Cu to 3-week periphyton photosynthetic efficiency showed a positive correlation between EC_x and periphyton suspension concentration, whatever the exposure duration (Table IV.1.; Fig IV.3.). For example, after 6 h of incubation, EC_{50} increased about 14-fold between the most diluted periphyton suspension (D4, mean $EC_{50} = 0.09 \text{ mg L}^{-1}$) and the least (D1, mean $EC_{50} = 1.23 \text{ mg L}^{-1}$), which was characterized by chl *a* concentrations ($6980 \mu\text{g L}^{-1}$) about 17 times higher than chl *a* concentrations in D4 samples ($420 \mu\text{g L}^{-1}$). Also, the positive linear relationship ($p < 0.05$) was observed between chl *a* concentrations in periphyton suspension and both EC_{50} and EC_{10} values (Fig IV.3), whatever the periphyton maturation stage (3 and 5 weeks). A significant linear relationship ($p < 0.05$) was also obtained when comparing EC_x and total biomass (based on DW measurement), which was determined for the 5-week periphyton (data not shown). These results thus highlight the marked influence of the periphyton suspension concentration on tolerance measurement in toxicity tests. Performing short-term toxicity tests based on β -glucosidase enzymatic activity, Fechner *et al.* (2010) also observed an increase in EC_{50} values with an increase in concentration of periphyton suspensions. Ahuja *et al.* (1999) showed that increasing biomass concentration from 0.04 to 0.20 g DW L^{-1} decreased the level of metal binding per unit cell mass. In addition, according to Monteiro and Castro (2012), the effective surface area available for sorption, and the average distance between available adsorption sites, is reduced by partial aggregation of biomass at high biomass. These studies therefore suggest that the observed increase in tolerance to Cu at higher periphyton suspension concentration in the present study is due, at least partially, to a decrease in periphyton exposure to Cu during toxicity testing.

We also tested, with a 3-week periphyton, and for the various periphyton suspension concentrations, the influence of exposure duration (2, 4 and 6 h) to Cu on the tolerance measurement (Table IV.1.). Despite the increase in EC_{50} values with the increase in periphyton suspension concentration used in the toxicity test, no significant difference was observed for this parameter between the three tested exposure durations (2 h, 4 h and 6 h of incubation), whatever the periphyton dilution (D1 to D4). Effects of exposure duration on EC_{10} were also imperceptible or very limited, the only significant differences being observed between 4 h and 6 h of incubation for the periphyton suspension concentration D3, with values of the same order of magnitude (0.01 to 0.05 mg L^{-1}). Within the range of test

conditions in the present study (2–6 h), exposure duration had a negligible influence on the measurement of tolerance to Cu whatever the periphyton suspension concentrations. Tlili *et al.* (2011) also observed that the dose-response curve did not change with longer exposure to copper (3, 4 and 6 h) when performing toxicity tests based on respiration, and they opted for the shorter exposure time. In our toxicity tests based on photosynthetic efficiency, a 2 h incubation seems sufficient for the cellular uptake of Cu. Thus we decided to perform the following short-term toxicity tests (toxicity test with a 5-week periphyton) using 2 h of incubation as previously used by Tlili *et al.* (2010).

		EC ₅₀	EC ₁₀
D4	2 h	0.21 ± 0.07	0.02 ± 0.02
	4 h	0.08 ± 0.02	0.01 ± 0.01
	6 h	0.09 ± 0.02	0.02 ± 0.02
D3	2 h	0.11 ± 0.02	0.03 ± 0.02 (ab)
	4 h	0.10 ± 0.03	0.01 ± 0.01 (b)
	6 h	0.13 ± 0.02	0.05 ± 0.02 (a)
D2	2 h	0.27 ± 0.05	0.11 ± 0.05
	4 h	0.30 ± 0.09	0.05 ± 0.02
	6 h	0.30 ± 0.06	0.06 ± 0.02
D1	2 h	0.76 ± 0.24	0.13 ± 0.06
	4 h	0.92 ± 0.31	0.18 ± 0.09
	6 h	1.23 ± 0.52	0.19 ± 0.08

Table IV.1. Mean (\pm s.d ; n = 3) EC₅₀ and EC₁₀ (mg Cu L⁻¹) for periphyton suspension concentrations, ranging from about 400 µg chl a L⁻¹ (D4) to about 7000 µg chl a L⁻¹ (D1) after 2, 4 and 6 h of incubation. Different letters (a, b, c) indicate significant difference between EC₁₀ values ($p < 0.05$), within the D3 dilution.

The third parameter tested was the influence of the maturation stage of the periphyton. EC₅₀ and EC₁₀ were determined from short-term toxicity tests, after 2 h of incubation, performed with 3- and 5-week periphyton (Fig IV.4.), considering different periphyton suspension concentrations (D4 to D1). At equal periphyton suspension concentration, and despite the variability between replicates, EC_x mean values were higher for 5-week periphyton than for 3-week periphyton (EC₅₀: D3 $p < 0.05$; EC₁₀: D1, D3 $p < 0.05$, Fig IV.4.).

In the present study, phototrophic periphyton had a greater tolerance to Cu at higher maturation stage, highlighting the potential variability of tolerance levels with periphyton maturation stage during toxicity tests. This result is consistent with the study of Ivorra *et al.* (2000), who showed a variation in the effects of metal exposure (Zn and Cd) with the developmental stage of the periphyton. They observed that mature periphyton were more

resistant to metals, even without a history of pre-exposure. A resistance to Cd was also observed on mature phototrophic periphyton by Duong *et al.* (2010). Studying Cu effects, Tien and Chen (2013) explained the decreased metal accumulation in a more mature periphyton by a decrease in metal-binding capacity thus probably reducing the exposure of periphyton communities. These results could explain our findings concerning the increased tolerance to Cu at higher periphyton maturation stage during toxicity tests. In addition, although the relationship between EC_x values and chl *a* concentrations (used as a proxy of periphyton suspension concentration for the toxicity test) was significant ($p < 0.05$) whatever the age of the periphyton, it was modulated according to the sample considered (3 or 5 weeks; Fig IV.3.) as shown by the significant difference in slope values ($p < 0.05$). The slope value of the linear relationship obtained with a 5 weeks periphyton was significantly higher than that obtained with a 3-week periphyton ($p < 0.05$), thus suggesting that at higher biomass, the protective effect is stronger for a periphyton at a later maturation stage.

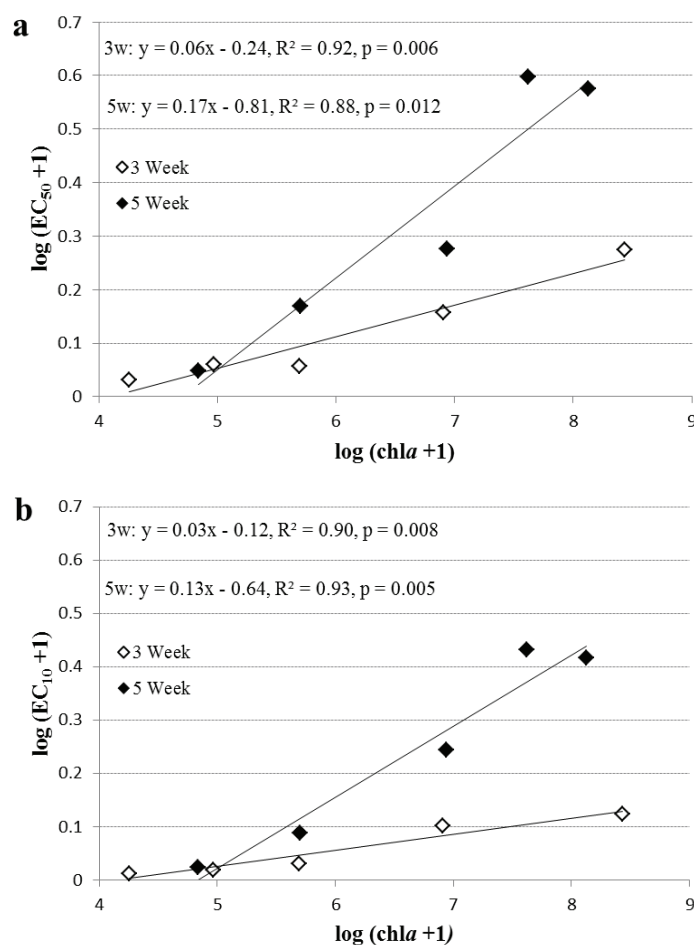


Figure IV.3. Linear relationship between mean chl *a* concentrations in periphyton suspension ($\mu\text{g L}^{-1}$) and (a) mean EC_{50} and (b) mean EC_{10} (mg Cu L^{-1}) during toxicity tests performed with a 3- and 5-week periphyton after 2 h of incubation.

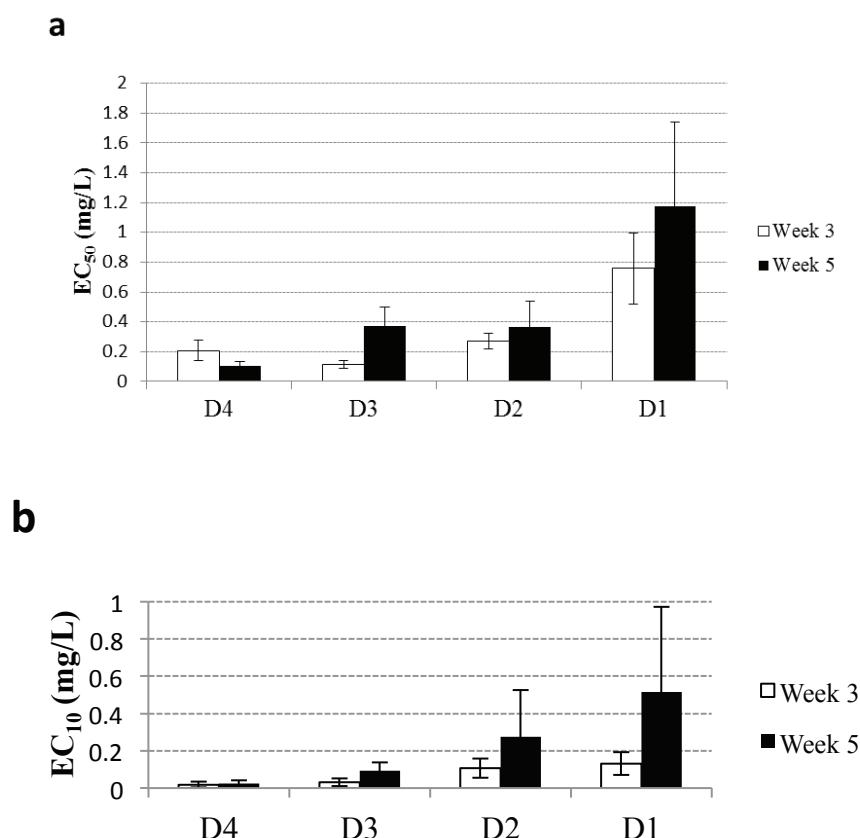


Figure IV.4. Mean (\pm s.d ; n=3) for (a) EC_{50} and (b) EC_{10} (mg Cu L⁻¹) for periphyton suspension concentrations, ranging from about 400 μ g chl a L⁻¹ (D4) to about 7000 μ g chl a L⁻¹ (D1) during toxicity tests performed with a 3- and 5-week periphyton after 2 h of incubation.

2.3.2. Standardization perspectives

The results of this study argue for more standardized procedures adapted to PICT approaches. Among the different parameters tested, exposure duration seems to have the least influence on tolerance measurement. However, short-term toxicity tests are generally performed in small water volumes with limited periphyton quantities, which can quickly induce significant changes in microbial community because of the "bottle effect". This was first observed by Schelske (1984), who showed that effects of confinement on the structure of phytoplankton communities could outweigh toxicant effects. However, PICT is based on the fact that a chronic exposure of communities to a toxicant can induce shift in species composition, thus leading to an increase in tolerance capacities. Indeed, it is better to limit as much as possible community changes during toxicity testing (i.e. PICT detection). Accordingly, we recommend short exposure (i.e. 2 h). Based on literature analysis, this

duration seems sufficient to assess short-term effects of other metals, such as zinc, nickel and silver, on phototrophic periphyton (Soldo and Behra, 2000)

By contrast, we showed that periphyton biomass in the tested suspension (in terms of both chl *a* concentrations and DW) is a crucial determinant in toxicity assessment because of its significant influence on tolerance level. Consequently, this parameter should be standardized to obtain comparable results between studies. Previous authors suggested using an *a posteriori* normalization of toxicity data, based on periphyton biomass (Soldo and Behra, 2000; Fechner *et al.* 2010; Lambert *et al.* 2012). In these studies, toxicity data were normalized by dividing EC_x by the periphyton dry weight (expressed in grams of dry matter per liter) (Fechner *et al.* 2010) or by the chl *a* concentration in the periphyton suspension (Soldo and Behra, 2000; Lambert *et al.* 2012). However, our results revealed that the linear relationship observed between EC_x and periphyton suspension concentration (expressed as chl *a* or DW) depends on periphyton maturation stage, as shown by the significant difference in the slopes of the relationship observed respectively with 3-week and 5-week periphyton (ANCOVA $p < 0.05$, Fig IV.3.). Accordingly, an *a posteriori* normalization could sometimes be inappropriate since periphyton structure continuously evolves, and can differ widely according to numerous biotic and abiotic parameters. More generally, and independently of the importance of the maturation stage, our results suggest that the relationship between EC_x and chl *a* is probably highly periphyton-dependent. Hence in order to take into account the differences between sampling sites or between sampling periods and thus enable data toxicity comparisons, an *a priori* normalization of the periphyton suspension biomass is advocated.

However, one challenge of such an *a priori* normalization resides in the fact that toxicity tests must be performed with fresh periphyton, rapidly after sample collection. As DW measurement is time-consuming because of methodological constraints, the use of chl *a* concentrations, as a proxy of biomass, could be a good alternative, because of the possible use of PhytoPam (or other fluorimetric measurement), which allows an immediate estimation of chl *a* concentrations. In the present study, this alternative appears methodologically robust as shown by the close positive linear relationship between DW and chl *a* obtained in the various dilutions performed with the 5-week periphyton ($p < 0.001$, Fig IV.5.). Hence it would be of interest to check whether this relationship between DW and chl *a* extends to periphyton with higher abundances of heterotrophic microorganisms. It can be argued that such *a priori* normalization would require using disrupted periphyton (suspension periphyton). The use of disrupted or intact periphyton in short-term toxicity assessment is a recurrent debate, and it is known that the periphyton structure (i.e. suspended or attached) influences response to acute

metal exposure. Given the protective role of the periphyton matrix, which limits the penetration of toxicants, undisrupted periphyton communities are generally more tolerant to metals than suspended periphyton communities (Barranguet *et al.* 2000; Guasch *et al.* 2003). Nevertheless, the high resistance of thick periphyton to metals can be mainly related to the physical structure of the assemblage, independently of species composition and their intrinsic tolerance properties (Barranguet *et al.* 2000). This can introduce a potential source of bias in PICT approaches which aim at evaluating changes in tolerance at the community level. Furthermore, since *a priori* normalization of periphyton biomass on attached assemblages appears impossible, our results offer new arguments in support of using disrupted periphyton, as is the case in many PICT studies (e.g. Soldo and Behra, 2000; Dorigo *et al.* 2010; Tlili *et al.* 2010). According to the EC_x values obtained, it seems preferable to consider low periphyton biomass ($chl\ a < 3000\ \mu g\ L^{-1}$ or $DW < 0.4\ mg\ mL^{-1}$ in our case) in order to reduce the variability observed between replicates, because of the difficulty in homogenizing disrupting periphyton samples at high suspension concentrations.

We also confirmed in the present study the importance of the maturation stage of the periphyton used for toxicity tests. This raises particular concerns when using PICT approaches in natural environments with periphyton collected on natural substrates, without knowledge about the colonization duration. One possible alternative is the use of artificial substrates, as chosen by many authors (Guasch *et al.* 2003; Dorigo *et al.* 2010; Morin *et al.* 2010), despite the well-known biases due to the fact that artificial substrates do not perfectly reflect natural substrates (Peterson *et al.* 1989; Potapova *et al.* 2005). This alternative is of particular interest in PICT studies designed to assess spatial and/or temporal changes in tolerance. In this context, we note that it could be of interest to define the recommended colonization time before a periphyton can be used in toxicity tests. However, and given the fact that periphyton maturation greatly depends on various environmental factors and is strongly site-dependent, this parameter is probably one of the most difficult to define with a view to a better standardization of PICT approaches.

In addition to parameters considered in our study, it would be of interest to further identify and test other factors that could significantly influence results and conclusions from PICT studies (e.g. temperature incubation or light intensity).

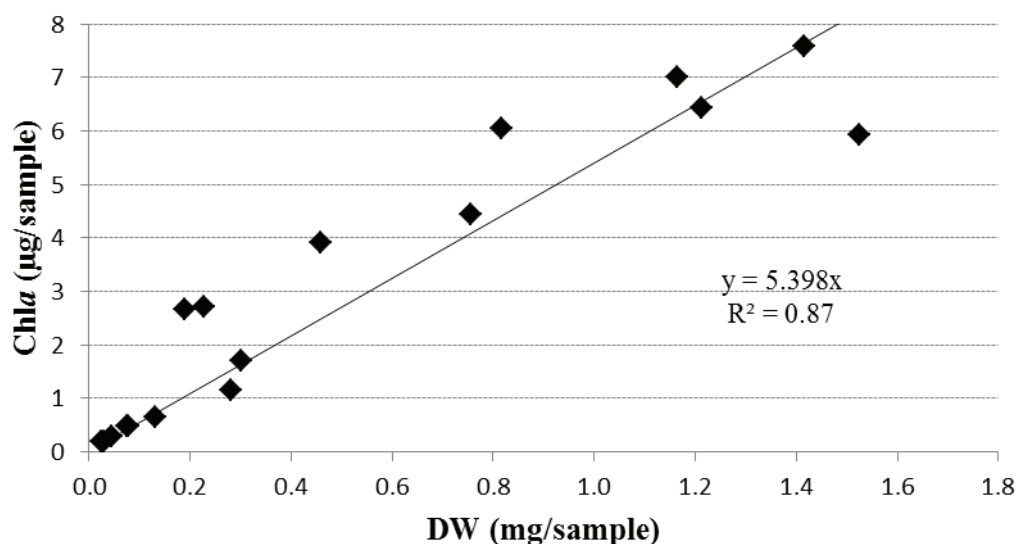


Figure IV.5. *Linear relationship between chl a (µg/sample) and DW (mg/sample) obtained with 5-week periphyton. chl a concentrations and dry weight are in relation to the total volume of the periphyton suspension used during toxicity testing.*

Acknowledgments We thank ATT for English-language editing. We also thank Bernard Motte, Christophe Rosy and Bernadette Volat for technical support, and Irstea's Water Chemistry Laboratory (LAMA). This study was partially funded by the French National Research Agency (project ANR-CESA-Potomac 2012–2015).

3. Influence of temperature on pollution induced community tolerance approaches used to assess effects of copper on freshwater phototrophic periphyton

In preparation for Aquatic Toxicology

Anne Sophie Lambert¹; Aymeric Dabrin¹; Arnaud Foulquier²; Soizic Morin³; Christophe Rosy¹; Marina Coquery¹; Stéphane Pesce¹

¹ Irstea, UR MALY, 5 rue de la Doua, CS 70077, F-69626 Villeurbanne Cedex, France.

² Laboratoire d'Écologie Alpine - UMR CNRS 5553, Université Grenoble Alpes, BP 53, 38041 Grenoble Cedex 9, France.

³ Irstea, UR EABX, F-33612 Cestas, France.

Abstract

Pollution-induced community tolerance (PICT) approaches involve measuring tolerance levels of natural communities to toxicants using short-term toxicity tests performed under controlled conditions. However, results from PICT approaches can be modulated by (i) several environmental factors, which can limited the establishment of a causal relationship between the effects of a chronic toxicant exposure and the PICT response, and (i) various experimental conditions applied during short-term toxicity tests, raising questions about their reproducibility and comparability. Given the increase in extreme climate events, associated with climate change, freshwaters are increasingly exposed to strong fluctuations in temperature. However, almost nothing is known about the influence of this parameter on PICT approaches, both in term of tolerance acquisition following chronic exposure to toxicants and in term of tolerance measurement, during short-term toxicity tests. Hence, the objective of our microcosm study was to evaluate the influence of temperature on (i) tolerance acquisition of phototrophic periphyton to a 5-week chronic exposure to Cu (nominal concentration of 60 µg L⁻¹) and on (ii) the measurement of resulting tolerance levels. Our results showed a great reduction of tolerance acquisition to Cu of phototrophic periphyton communities chronically exposed to Cu at 28°C compared to those exposed at 18°C. The same tendency was also observed with non-exposed communities, despite a lack of significant difference according to the growth temperature. In contrast, the incubation temperature applied during short-term toxicity tests did not affect tolerance measurement, in the range of temperature tested, whatever the exposure conditions.

Keywords: Biofilm; Metal; Microbial Ecotoxicology; Multistress; PICT; Short-term toxicity tests.

3.1. Introduction

Periphyton is a complex assemblage of phototrophic and heterotrophic microorganisms embedded in a polysaccharide and protein matrix. Since structural and functional responses of periphyton to environmental changes occur within a few weeks, periphyton can constitute an early-warning indicator of pollution in aquatic systems (Sabater *et al.* 2007). However, one of the most critical issues in assessing the effects of toxicants on natural microbial communities is distinguishing between these effects and those resulting from other environmental parameters such as light and nutrients, for instance (Pesce *et al.* 2010). In that way, the pollution-induced community tolerance (PICT) approach potentially offers the possibility to isolate (at least partially) the effects of individual toxicants within an ecosystem subjected to multiple stressors by studying shifts in community sensitivity (Schmitt-Jansen *et al.* 2008, Tlili *et al.* 2015). The principle of PICT is based on the fact that chronic exposure of a biological community to a toxicant can drive a species succession, resulting in a replacement of the sensitive species by more tolerant ones (Blanck, 2002), and/or in specific mechanisms of adaptation such as detoxification (Tlili and Montuelle, 2011). Thus, the resulting tolerance at community level can be evaluated as an increase in effective concentrations (e.g. EC₅₀) following acute exposure to this toxicant, using the theoretical basis of toxicology (the dose-response model) (Schmitt-Jansen *et al.* 2008).

Despite the development of more sustainable urban and industrial water management and agricultural practices, freshwaters remain frequently contaminated by heavy metals, which are potentially toxic for aquatic microbial communities (e.g. Gustavson and Wängberg, 1995; Fechner *et al.* 2010; Rotter *et al.* 2011). Among metals, copper (Cu) is a widespread contaminant in rivers located in agricultural areas, notably due to its use as fungicide in conventional and organic agriculture (Baron *et al.* 1995). It is well known that chronic exposure to Cu can functionally impair phototrophic microbial communities by reducing photosynthetic activity (Soldo and Behra, 2000; Lambert *et al.* 2012). It can also impact community structure *via* changes in distribution of algal classes and taxonomic composition of diatom communities (Morin *et al.* 2012; Serra and Guasch, 2009). These changes can ultimately increase phototrophic community tolerance to Cu, according to the PICT concept (Soldo and Behra, 2000; Tlili *et al.* 2010). In lotic ecosystems, the evaluation of tolerance levels of phototrophic periphyton communities towards herbicides or metals, such as Cu, are generally performed by measuring photosynthetic parameters (Dorigo *et al.* 2010; Foulquier *et al.* 2014).

However, there is now evidence that tolerance induction to one toxicant can be modified by external factors, such as light (Guasch *et al.* 1998; Guasch and Sabater, 1998), nutrients (Tlili *et al.* 2010) or other toxicants favoring co-tolerance effects (Schmitt-Jansen *et al.* 2008); and by internal characteristics such as periphyton biomass (Guasch *et al.* 2003; Lambert *et al.* 2015) or community composition and species interactions (Guasch *et al.* 1998; Bérard *et al.* 1999). Consequently, one current challenge in PICT assessment is still to improve the distinction between the effects of toxicants and those resulting from other environmental factors.

Given the increase of extreme climate events associated with climate change, freshwaters are increasingly exposed to strong fluctuations in temperature which can extend beyond the temperature variations on seasonal and daily basis (Smith, 2011). In lotic ecosystems, such variations can impact periphyton and thus potentially influence community tolerance to toxicants. Indeed, Boivin *et al.* (2005) showed in a microcosm study that periphytic bacterial communities growing at 14°C and 20°C under Cu exposure, were respectively three-fold and six-fold more tolerant to this toxicant than communities growing at 10°C. In the same way, Lambert *et al.* (submitted) suggested an increase in Cu-tolerance of phototrophic periphyton with temperature (from 8°C to 23°C), according to the selection of more Cu-tolerant diatom species at higher temperatures. Hence, such results raise questions about the comparability of Cu-tolerance levels determined in studies performed under different experimental conditions. Moreover, another question arises regarding the potential influence of temperature during a short-term exposure to Cu and its effect on tolerance measurement. According to the literature, short term toxicity tests in field or microcosm studies are generally performed at laboratory ambient temperature (Serra and Guasch, 2009; Dorigo *et al.* 2010), even though such toxicity tests are sometimes performed at periphyton growth temperature (Tlili *et al.* 2010). However, the laboratory ambient temperature can sometimes be very different from the temperature experienced by phototrophic periphyton communities during growth and chronic exposure to a toxicant. This is especially the case when community tolerance is measured across seasons in field monitoring studies. For example, Dorigo *et al.* (2010) performed a tolerance assessment of river phototrophic periphyton to Cu at ambient temperature (i.e. 20°C, whatever the season), while growth temperature in the field varied between 5.0 and 15.7°C, according to the period and the sampling site. Thus, the incubation temperature (i.e. 20°C), was probably sometimes far from the thermal optimum of periphyton communities, thus potentially inducing an additional stress during the toxicity test. Consequently, it appears crucial to evaluate the possible influence of incubation temperature, applied during short-term

toxicity test, on tolerance measurement. This could be an important step towards a better standardization of PICT measurement (Lambert *et al.* 2015; Tlili *et al.* 2015).

Given this background, the aim of our work was to assess the influence of temperature on (i) tolerance acquisition of phototrophic periphyton to chronic exposure to Cu, and (ii) on tolerance level measurement. Accordingly, we developed a microcosm approach combined with short-term toxicity tests to determine the influence of growth and incubation temperature, during the selection and the detection phases of PICT method, respectively.

3.2. Material and Methods

3.2.1. Experimental setup

The microcosm experiment was carried out in May 2014 using 12 independent aquariums (glass, 40 × 20 × 25 cm) incubated in two tanks (polyethylene, 250 L, 121 × 81 × 33 cm) containing water thermoregulated at 18°C (which was close to the average temperature measured in the field during the sampling period) and 28 °C, respectively (Fig IV.6.). This high temperature was chosen to assess the influence of a strong increase in temperature (+10°C), on tolerance acquisition and measurement.

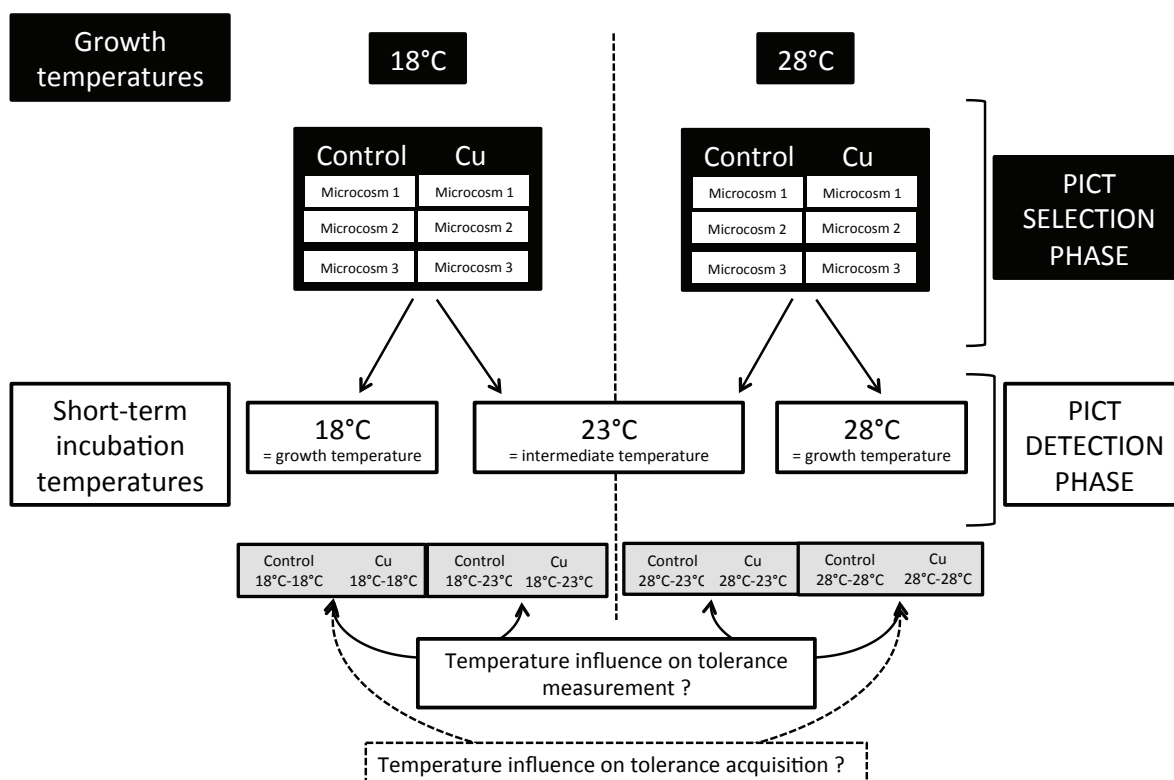


Figure IV.6. Experimental strategy: temperatures applied during selection (i.e., growth temperature) and detection (i.e., short-term incubation temperature) phases of PICT method.

In each tank, 6 microcosms were filled with reconstituted water consisting of 75:25 (v/v) distilled water:groundwater supplemented with nutrients in order to adjust the conductivity (i.e. about $180 \mu\text{S cm}^{-1}$) and nutrient concentrations (i.e. 15 mg L^{-1} of silica; 8 mg L^{-1} of nitrates; 0.2 mg L^{-1} of phosphates) to the characteristics of the surface water at the periphyton sampling site (Dorigo *et al.* 2010) (Table IV.2.). Each microcosm was fitted with one submersible pump (New Jet 800) to maintain water mixing and oxygenation; and each tank was fitted with three submersible pumps to homogenize water temperature. High-pressure sodium lamps were used to deliver a constant light intensity of 3500 lux ($42.7 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) under a 13 h/11 h light/dark photoperiod, corresponding to the field conditions at the period of sampling. Three microcosms were used as “Control” microcosms (without Cu addition) and three “Cu” microcosms were supplemented with $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ to obtain a Cu concentration close to $60 \mu\text{g L}^{-1}$. This high Cu exposure level was chosen in order to promote the selection of tolerant species and to induce significant changes in community composition

compared to that of non-exposed communities in Control microcosms. To avoid Cu adsorption by the experimental equipment during the exposure period, Cu microcosms (including glass slides and pumps) were contaminated using the same Cu concentration for 24 h before the start of the experiment. All the microcosms were filled with uncolonized artificial substrates (glass slides) to allow periphyton settlement during the experiment. Just prior the experiment, stones were collected at the reference upstream site of the Morcille River (Beaujolais, Eastern France, see Montuelle *et al.* (2010) for details). The periphyton was scraped and suspended in river water in order to obtain a periphytic inoculum, which was homogenized before being added at the start of the experiment (week 0), in equal volumes, in all microcosms.

This study was conducted for 5 weeks. During week 1, the water level of each microcosm was adjusted and each nutrient was added to maintain the initial trophic conditions. Then, water was renewed weekly to maintain Cu exposure and avoid nutrient depletion. From week 2 to week 5, the main physical-chemical parameters of the water were measured in each aquarium before and 2 h after each water renewal. Conductivity, pH, and dissolved oxygen concentrations were measured using portable meters (WTW, Germany). Water samples were collected at the same time for subsequent laboratory analyses.

Water temperature was recorded every hour with data loggers (HOBO® Pendant Temperature/Light, Prosensor). Water temperatures in the microcosms were close to the targeted ones with mean values of 18.3°C (± 0.5) and 27.0°C (± 1.8) respectively, without significant difference between Control (i.e. without Cu addition) and Cu microcosms (data not shown).

	Initial conditions (after water renewal)		Conditions after 1 week (before water renewal)			
	All microcosms (n=12)		Control (n=3)		Cu (n=3)	
			18°C	28°C	18°C	28°C
pH	8.7 ± 0.4		8.5 ± 0.3	8.8 ± 0.2	8.3 ± 0.3	8.5 ± 0.5
Conductivity (µS cm ⁻¹)	146 ± 4		132 ± 13	127 ± 22	148 ± 4	153 ± 11
DO (mg L ⁻¹)	8.64 ± 0.62		9.53 ± 0.54	8.68 ± 0.37	9.32 ± 0.37	8.11 ± 0.69
DOC (mg L ⁻¹)	<0.5		1.01 ± 0.41	1.21 ± 0.27	0.60 ± 0.10	0.87 ± 0.68
NO ₃ (mg L ⁻¹)	6.43 ± 0.53		2.60 ± 2.40	2.40 ± 2.10	5.28 ± 1.05	5.41 ± 1.54
NO ₂ (mg L ⁻¹)	<0.02		<0.02	0.03 ± 0.02	0.02 ± 0.01	0.08 ± 0.04
NH ₄ (mg L ⁻¹)	<0.02		<0.02	<0.02	0.03 ± 0.01	0.07 ± 0.05
PO ₄ (mg L ⁻¹)	0.20 ± 0.04		0.04 ± 0.01	<0.03	0.10 ± 0.06	0.07 ± 0.05
SiO ₂ (mg L ⁻¹)	4.40 ± 0.74		1.10 ± 1.06	0.76 ± 0.48	4.40 ± 1.01	4.83 ± 1.45

Table IV.2. *Physico-chemical characteristics of water in the Control and Cu microcosms for the 4 tested conditions before (i.e. conditions after 1 week) and 2 h after (i.e. initial conditions) each water renewal, during 5 weeks; (mean value ± standard deviation [s.d.], n=3). DO, dissolved oxygen; DOC, dissolved organic carbon.*

3.2.2. Chemical analyses

Standard operating procedures were followed to determine the concentrations of orthophosphates (PO_4 ; NF EN ISO 6878), nitrates (NO_3 ; NF EN ISO 10304), nitrites (NO_2 ; NF EN 26777), ammonium (NH_4 ; NF T 90-015-2), silica (SiO_2 ; NF T 90-007) and dissolved organic carbon (DOC; NF EN 1484).

In order to measure dissolved Cu concentrations, 30 mL of channel water were sampled before and after each water renewal, filtered (0.45 μm polyvinylidene difluoride (PVDF) filter, Whatman) and acidified with 0.5% (v:v) of nitric acid (Suprapur, Merck), before being stored at 4°C until analysis. Filtered water samples were analyzed using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS XSeries II, Thermo Electron). Quality controls were routinely checked using a certified reference material (Environment Canada, TM 27-3, Lake Ontario natural water) to control analytical accuracy (97%) and precision ($\pm 12\%$).

In Control microcosms, dissolved Cu concentrations remained very low ($0.4 \pm 0.1 \mu\text{g L}^{-1}$) throughout the experiment. Two hours after water renewal, mean dissolved Cu concentrations in all Cu microcosms were $63.0 \pm 8.8 \mu\text{g L}^{-1}$, with a strong decrease, during the week following the water renewal (i.e about 50 %; data not shown) as previously shown in a similar microcosm study (Lambert *et al.* 2012).

3.2.3. Periphyton characterization and tolerance assessment

In control microcosms, algal biomass rapidly increased and the periphytic assemblages reached the maturation stage after about three weeks. Nevertheless, Cu induced a slower algal growth, so algal biomass was not sufficient to assess tolerance levels of Cu-exposed communities at week 3. Accordingly, we decided to perform periphyton characterization and tolerance assessment after 3 weeks of development for Control communities (to limit cell detachment), and after 5 weeks of development for Cu communities.

Periphyton was carefully scraped from the slides with a razor blade and suspended in 1:1 (v/v) demineralized:mineral water (Volvic, France) before being homogenized and divided in different volumes, in order to measure the following parameters.

To measure algal cell density, 2 mL of periphyton suspension were immediately fixed in formalin (37 % formaldehyde, Prolabo, France) for counting. Each sample was counted using a Nageotte counting chamber (Marienfeld, Germany). After homogenization, 125 μL of sample was placed in the counting chamber and the total number of cells was recorded in 10 fields of the gridded area (1.25 μL each, 0.5 mm depth) under light microscopy at x400

magnification (Olympus BX51 upright microscope, UK). Distinction between dead and live organisms before fixation was performed by observation of the turgescence and colour of the chloroplast as described in Morin *et al.* (2010).

Aliquots of periphyton suspension (3 mL) were also used to determine total chlorophyll *a* (chl *a*) and photosynthetic efficiency by multi-wavelength pulse-amplitude-modulated (PAM) fluorometry on a Phyto-PAM system (H. Walz, Germany) as described in Schmitt-Jansen and Altenburger (2008). Photosynthetic efficiency was based on the measurement of PSII quantum yield (PSII yield) of algae (Schmitt-Jansen and Altenburger, 2008), which allows to assess the physiological state of the phototrophic communities (Tlili *et al.* 2010).

Photosynthetic efficiency was also used as endpoint to assess the tolerance of phototrophic periphyton communities to Cu in the PICT approach, following Lambert *et al.* (2015), with slight modifications. Given the influence of periphyton biomass on PICT measurement (Lambert *et al.* 2015), we diluted the initial periphyton suspension with an equivalent mixture of demineralized water and mineral water (Volvic, France) to obtain a periphyton suspension concentration of about 2000 µg chl *a* L⁻¹ (as measured with the PhytoPAM fluorometer) for each sample.

A semi-logarithmic series of Cu concentrations was freshly prepared in the same 1:1 demineralized:mineral water mixture, to obtain 9 Cu concentrations, ranging from 0.32 to 3200 mg L⁻¹. The Cu concentration of each solution was analyzed by ICP-MS as described above. Then, 1.8 mL of the periphyton suspension were exposed for 2 hours to 0.9 mL of the different Cu solutions, to obtain final Cu concentrations ranging from 0.1 to 1000 mg L⁻¹.

The short-term incubation of 2h was performed in climatic chambers (MLR-350 Versatile Environmental Test Chamber, Sanyo) under artificial light (1400 lux). In order to evaluate the influence of growth temperature on tolerance acquisition (i.e. during PICT selection phase), the short-term incubation was achieved at the temperature of the microcosms during growth (i.e. 18 and 28°C, respectively) (Fig IV.6.). Additionally, to assess the influence of incubation temperature on tolerance measurement (i.e. PICT detection phase), the short-term incubation was also achieved at an intermediate temperature (23°C) (Fig IV.6.).

After 2 hours of incubation with the 9 Cu solutions and the water blank, periphyton suspensions were kept for 30 min in a dark chamber before measuring PSII (665nm), using the PhytoPAM. For each sample, 5 blanks and 3 analytical replicates per Cu concentration were analyzed.

3.2.4. Statistical analysis

Variations in water and periphyton characteristics (physico-chemical characteristics, chl a , PSII yield, cellular density) among treatments and thermal conditions were tested using 2-way repeated measures ANOVA followed by a *post hoc* Tukey test in R version 2.15.0 (R Development Core Team 2012). Data were log-transformed before statistical analysis to satisfy the assumption of normality and homogeneity of variances. The analysis of results from short-term bioassay was conducted using functions from the ‘drc’ package (Ritz and Streibig, 2005) in R version 2.15.0 (R Development Core Team, 2012). Dose-response curves were fitted to the data using the four-parameter log-logistic model given by the formula:

$$response = c + \frac{d - c}{1 + \exp\{b \times (\log(Dose) - \log(e))\}}$$

where b denotes the slope of the curve around e ; c and d are the lower and upper limits of the curve, respectively; and e denotes the EC $_{50}$, the dose producing a response half-way between the upper and the lower limit of the curve. The response variable was expressed as the percentage of the yield of uncontaminated control assay. In addition, EC $_{50}$ were derived from each dose-response curve. Data from the three replicate bioassays were pooled to produce a single dose-response curve with the % inhibition of PSII yield as a function of Cu concentrations. Tukey HSD tests were used to determine significant differences in EC $_{50}$, upper and lower limits, slope and percentage of inhibition, between treatments.

3.3. Results and discussion

3.3.1. Temperature influence on tolerance acquisition

In order to test the influence of growth temperature on the PICT selection phase (Fig IV.6.), phototrophic periphyton communities grew at 18 and 28°C, in the presence or not of Cu, and toxicity tests were performed under incubation temperature similar to growth one (in order to avoid the possible temperature effect on acute exposure to increasing Cu concentrations).

At 18°C, which was representative of the river temperature during the initial periphyton sampling, Cu exposure induced a strong negative effect on total algal biomass (based on chl a fluorescence measurement; Fig IV.7.) and diatom cellular density (Fig IV.8.). Indeed, despite an increased growth period (two weeks more), total algal biomass was significantly lower ($p < 0.05$) in Cu-exposed communities, with chl a concentrations being 5

fold lower than those in Control communities. In the same way, diatom cellular density in Cu-exposed communities was only about 10 cells cm^{-2} , whereas diatom cellular density in Control communities reached almost 100,000 cells cm^{-2} , after only three weeks of growth. Reduction in algal growth due to chronic metal exposure has been also reported in other studies at lower Cu concentrations. Indeed, Serra and Guasch (2009) reported that a reduction of 42% in algal biomass occurred after 4 weeks of periphyton development in a 19°C water contaminated with Cu at concentrations of 32.5 $\mu\text{g L}^{-1}$. They also highlighted that this chronic Cu exposure level caused a shift in the dominant algal group leading to a replacement of diatoms by green algae. This is consistent with the decrease in diatom cellular density observed in our experiment within Cu-exposed communities (Fig IV.8.).

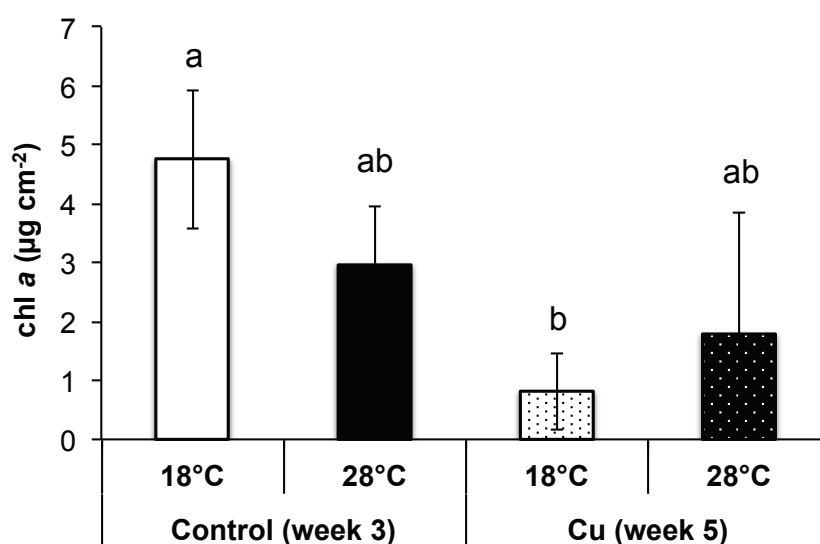


Figure IV.7. Concentrations (mean \pm s.d; n=3) of chlorophyll a (chl a, $\mu\text{g cm}^{-2}$) of Control and Cu-exposed communities at week 3 and 5, for 18°C and 28°C growth temperature. Different lowercase letters indicate significant differences ($p < 0.05$) between thermal and Cu exposure conditions.

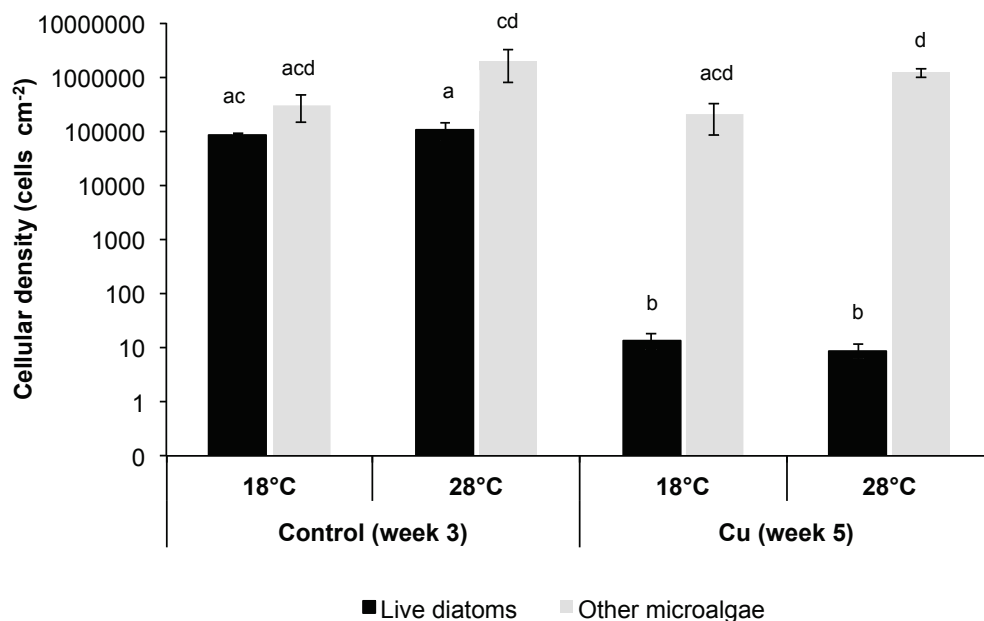


Figure IV.8. Cellular density (mean \pm s.d.; cells cm⁻²; n=3) of live diatoms and other microalgae of Control and Cu-exposed communities at week 3 and 5 for 18°C and 28°C growth temperature. Different lowercase letters indicate significant differences ($p < 0.05$) between thermal and Cu exposure contexts.

In our study, despite the significant effects of chronic Cu exposure on phototrophic periphyton structure, no functional effect was observed at 18°C, since PSII yield values were similar between Control and Cu-exposed communities ($p > 0.05$) (Fig IV.9.). Such a lack of effect at 18°C, suggest that Cu-exposed communities were able to cope with Cu exposure during growth, despite clear changes in community structure. As suggested by Guasch *et al.* (2002) and Serra and Guasch (2009), the structural changes following chronic toxicant exposure could be more prominent than physiological damage, supporting the hypothesis that periphyton could maintain a constant photosynthetic yield, although a large part of the algal biomass (mostly composed of sensitive species) was lost due to chronic exposure to Cu. However, yield values reflect physiological states of cells and not the total photosynthetic activity; so, it can be hypothesized that the total photosynthetic activity of Cu-exposed communities decreased due to the fall in the total algal biomass. Such an hypothesis is consistent with the results of Navarro *et al.* (2008), who suggested that the increase in the tolerance of a community exposed to a stressor would generate a cost of adaptation, which could lead to a biomass reduction and finally to a decrease in total primary production.

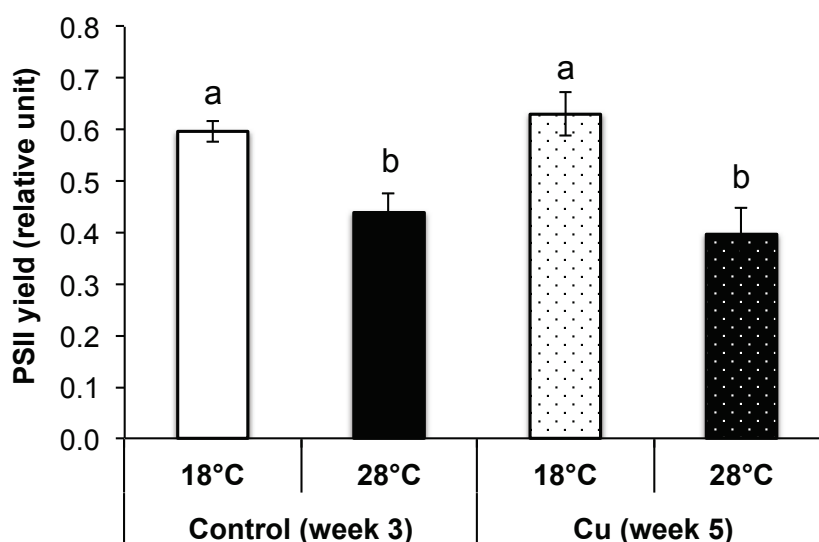


Figure IV.9. PSII yield (mean \pm s.d, in relative unit; n=3) of Control and Cu-exposed communities at week 3 and 5 for 18°C and 28°C growth temperature. Different lowercase letters indicate significant differences ($p < 0.05$) thermal and Cu exposure contexts

In our experiment, PICT results obtained with communities growing at 18°C reflected an adaptation of phototrophic periphyton to Cu following their chronic exposure to this toxicant (Table IV.3.). Indeed, at 18°C, Cu-exposed communities had a 18-fold higher tolerance level to Cu (EC_{50} of 44.8 ± 14.1 mg Cu L⁻¹) than Control communities (EC_{50} of 2.6 ± 0.3 mg Cu L⁻¹), supporting the hypothesis of a selection of more tolerant species. Likewise, Soldo and Behra (2000) reported a tolerance increase of phototrophic periphyton communities after 12 weeks of exposure to $63.5 \mu\text{g Cu L}^{-1}$ (nominal concentration), with EC_{50} values close to 9.5 mg L^{-1} , in contrast to EC_{50} of Control communities which reached only 1.6 mg L^{-1} . In this study, the tolerance levels were measured after 3 and 5 weeks in Control and Cu-exposed communities, respectively. Since it was showed that phototrophic periphyton maturation state could modify tolerance level to Cu (Lambert *et al.* 2015), it could be postulated that the difference in EC_{50} values observed in our study between Control and Cu-exposed communities at 18°C could have been due to a difference in growth duration. Nevertheless, given the fact that the algal growth was clearly delayed by Cu exposure as stated above (Fig IV.7.), the difference on growth duration could probably not solely explain the strong increase in tolerance level, especially when considering its magnitude.

To evaluate the influence of the growth temperature during the PICT selection phase, we assessed the effect of a 10°C temperature rise on tolerance acquisition of phototrophic periphyton communities. The EC_{50} of Cu-exposed communities at 28°C was more than 30-fold lower ($1.41 \pm 0.14 \text{ mg L}^{-1}$) than those of Cu-exposed communities at 18°C ($44.8 \pm 14.1 \text{ mg L}^{-1}$) (Table IV.3.), highlighting that the 10°C temperature increase led to a sharp decrease

in tolerance levels of Cu communities. Since EC_{50} values were not significantly different ($p>0.05$) from Control communities ($0.71 \pm 0.41 \text{ mg L}^{-1}$), there was no tolerance acquisition in Cu-exposed communities growing at 28°C. Furthermore, PSII yield was almost completely inhibited (i.e. 98%) when Cu-exposed communities growing at 28°C were exposed to the highest Cu concentrations tested in bioassays (i.e. lower limit); while PSII yield of Cu-exposed communities growing at 18°C was reduced only by about 64 % (Table IV.3.). Moreover, basal PSII yield (i.e. control bioassay C0; upper limit) of Cu-exposed communities was lower at 28°C (0.32 ± 0.03) than those at 18°C (0.53 ± 0.01) ($p<0.05$). The same significant decrease in PSII yield between 18°C- and 28°C- Cu-exposed communities was also observed when the measurement was performed immediately after periphyton sampling in the microcosms (Fig IV.9.). This strong decrease in PSII yield revealed a significant effect of the temperature increase on the physiological state of the phototrophic communities chronically exposed to Cu. Such an effect could have weakened the Cu-exposed communities growing at 28°C, decreasing their capacities to tolerate a subsequent acute exposure to copper, as suggested from the PICT measurement results. In Control communities, the 10°C temperature rise also led to a significant decrease of PSII values ($p<0.05$) (Fig IV.9.), highlighting a direct inhibitory effect of temperature (applied alone) on photosynthesis.

This finding is inconsistent with the results of Baulch *et al.* 2005, who reported an increase in photosynthetic activity of periphyton when temperature increased by 4.5°C (with initial temperature ranging between 9.3°C and 14.3°C). However, the thermal optimum for photosynthesis varies according to algal species (Necchi *et al.* 2004). This means that, at community scale, the impact of a rise in temperature could vary according to the taxonomic composition and to the thermal gradient tested. In our case, the 10°C temperature rise probably exceeded the threshold for community tolerance with regard to temperature; in contrast to the study of Baulch *et al.* 2005, where the temperature rise was in the range of the thermal optimum for photosynthesis (i.e. 20 – 25°C according to these authors). Consequently, besides an already strong sensitivity of Control communities to Cu at 18°C, the temperature increase seemed to also increase their sensitivity to Cu according to the lower EC_{50} value at 28°C ($0.71 \pm 0.41 \text{ mg L}^{-1}$) than at 18°C ($2.58 \pm 0.31 \text{ mg L}^{-1}$), even if this difference was not significant ($p>0.05$).

This increase in the sensitivity towards Cu at higher temperature in both control and Cu-exposed phototrophic communities could also originate from structural changes. Indeed, in our experimental conditions, both Cu exposure and the +10°C temperature increase were important drivers in phototrophic community evolution. With long term Cu exposure, diatoms were almost eliminated from the community: at 18°C, diatoms represented 27.2 ± 6.7 % of the unexposed microalgal community and their mortality was low (4.4 ± 0.4 %), whereas they only accounted for 0.01 ± 0.00 % of the Cu-exposed communities (with a mortality of 15.7 ± 9.7 %). On the other hand, the +10°C increase in temperature led to changes in the growth forms of green algae and cyanobacteria. Indeed at 18°C, in control and Cu-exposed communities, non-diatom algae were mostly solitary or forming short 3-5 celled fragments, whereas the higher temperatures favored long filamentous colonies.

However, the +10°C temperature increase could have favoured the development of species tolerant to a wide range of stresses (including Cu exposure); whereas at a temperature similar to field temperature (i.e. 18°C), species community composition was more likely to be driven by other factors, such as biotic relationships and contrasted competitive ability under Cu-challenged conditions (Morin *et al.* 2015). This hypothesis, supported by the dose-response curve obtained with Cu-exposed communities (Fig IV.10b.; Table IV.3.), suggests that green algae and cyanobacteria are more tolerant to Cu. The more heterogeneous algal community growing at 18°C, mostly composed of solitary cells probably with different sensitivity levels to Cu, could explain the higher tolerance to low Cu concentrations and the sharp decrease in PSII yield around the EC_{50} , as shown by the significantly higher slope (Table IV.3.) at 18°C (1.90 ± 0.37) than at 28°C (1.00 ± 0.38) ($p < 0.05$). In contrast, the community growing at 28°C could be composed of more homogeneous algal community (i.e. similar tolerance levels to Cu), and the cell association in large colonies may have contributed to reducing direct cell exposure (lower surface in contact with the medium).

Accordingly, these results suggest that, in our experimental conditions, temperature and metal stress acted antagonistically on community tolerance acquisition, with a reduced tolerance to copper of the Cu-exposed communities grown at 28°C. These results are quite divergent from the study of Lambert *et al.* (submitted), which revealed a selection of more Cu-tolerant diatom species, when temperature increased from 8°C to 23°C. However, in this previous study, the experimental conditions during the selection phase were different, with lower Cu concentrations ($15 \mu\text{g L}^{-1}$) and different periphyton inoculum (sampled in winter). Moreover, the temperatures considered in Lambert *et al.* (submitted) cannot be considered as

extreme temperatures since they may be found in the Morcille river over the year. In contrast, in the present study, communities were exposed to an extreme temperature, which is very rarely detected in this type of river (e.g. 26.9°C recorded on 21/07/2015; 6:00 pm on the downstream section of the Morcille River) as well as to a very high Cu exposure level. Taken together, all these results underlined that the magnitude and the direction of the influence of temperature on the acquisition of microbial tolerance toward Cu probably depend on various parameters such as the initial community composition and the sensitivity of the most thermotolerant species to Cu, as well as the stress conditions (i.e. Cu concentrations, exposure duration, range of temperatures...).

3.3.2. Temperature influence on tolerance measurement

Beside the influence of growth temperature on tolerance acquisition, we also evaluated the influence of incubation temperature on the PICT detection phase during short-term toxicity tests. Accordingly, phototrophic periphyton communities were incubated for 2 hours with the toxicant at their respective growth temperature (18°C or 28°C), and at an intermediate temperature (23°C) (Fig IV.6.).

When short-term toxicity tests were performed at 18 and 23°C for Control and Cu-exposed communities growing at 18°C, upper limits (i.e. yields of uncontaminated control assay; C0) were similar whatever the incubation temperatures tested ($p>0.05$) (Table III.2.), suggesting a lack of direct effect of short-term incubation temperature on basal photosynthetic yields. Moreover, incubation temperature did not have any effect ($p>0.05$) on the lower limit and the slope of dose-response curves (Fig IV.10., Table IV.3.). Also, there was no significant difference between EC₅₀ values obtained by performing short term toxicity tests at 18 or 23°C ($p>0.05$), for both Control (i.e. about 2 mg L⁻¹) and Cu-exposed (i.e. about 40 mg L⁻¹) communities. In the same way, at growth temperature of 28°C, there was no significant difference between EC₅₀ values obtained for short term toxicity tests performed under 28 and 23°C ($p>0.05$), both for Control (i.e. about 1 mg L⁻¹) and Cu-exposed (i.e. about 1.5 mg L⁻¹) communities. Accordingly, our results demonstrated that there was no influence of a 5°C variation in incubation temperature applied during short-term toxicity tests on the tolerance measurement, whatever the growth temperature and Cu exposure history.

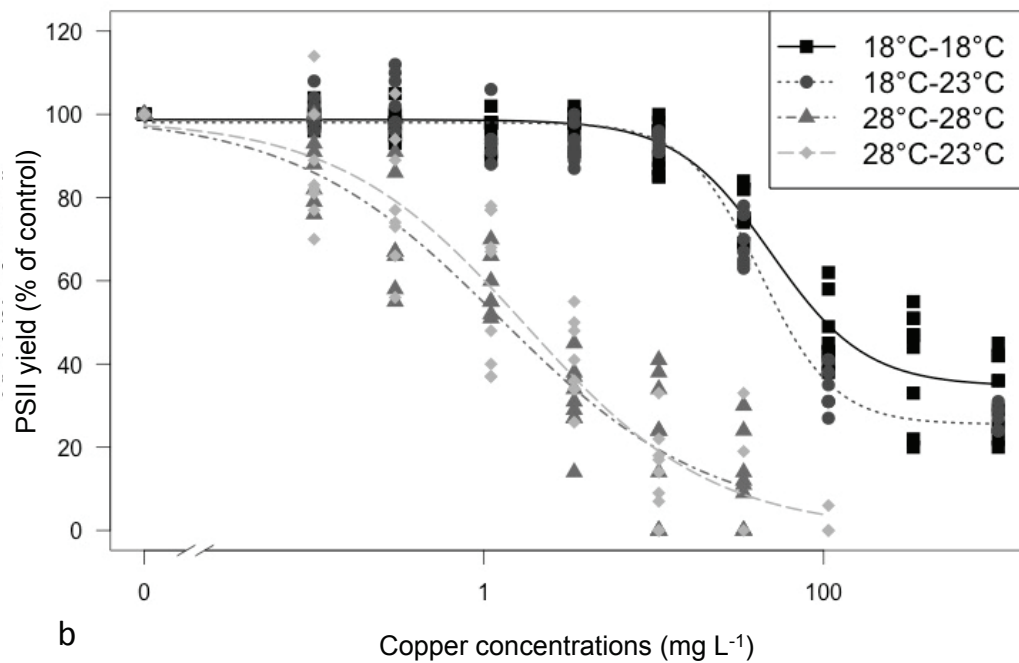
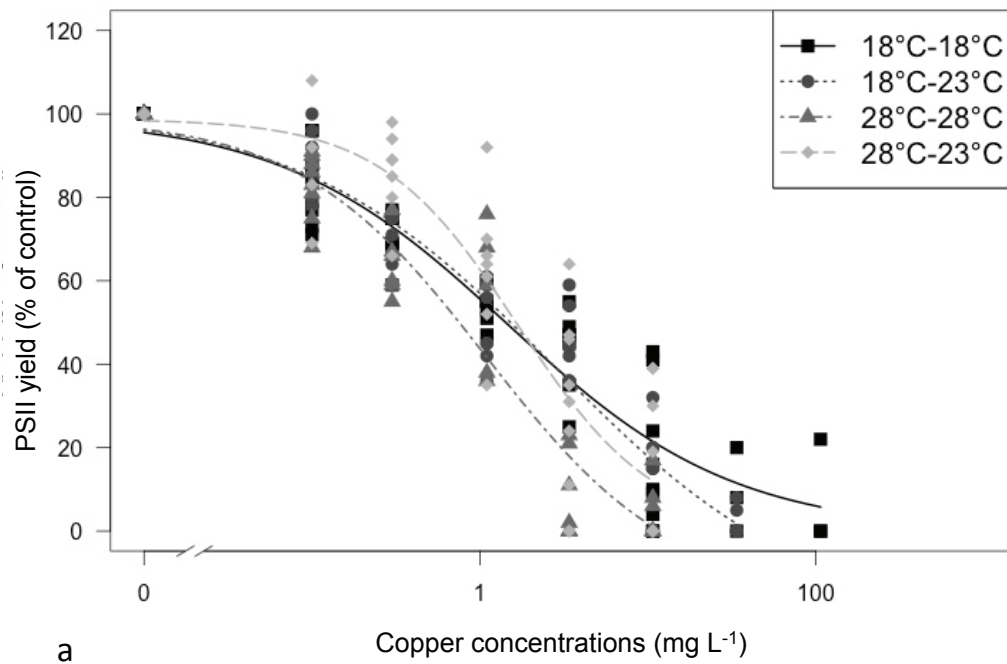


Figure IV.10. Dose–response curves showing inhibition of PSII yield with increasing concentrations of copper for Control and Cu-exposed communities, at week 3 (a) and week 5 (b), respectively. For each treatment, first and second temperatures represent growing and incubation temperatures respectively.

Our investigation on the influence of experimental conditions on PICT measurement addresses the challenge of improving the standardization of PICT approaches in view of promoting their integration within regulatory frameworks to assess ecological and chemical status of aquatic ecosystems (Tlili *et al.* 2015). In our experimental context and given the lack of influence of temperature during short-term incubation, we demonstrated that tolerance measurements could be performed at a fixed intermediate temperature, without interfering in the result interpretation. However, in the field, temperature can vary by more than 10°C between winter and summer, and also at the daily scale. For example, the difference between maximum and minimum daily water temperature of the Bela River at Podbanske (Slovakia) can reach up to 7 °C during sunny summer days (Pekárovà *et al.* 2011). Thus, it will be necessary to further testing the influence of incubation temperature in a context of higher differences in growth temperature (i.e. a difference in temperature of more than 5°C between growth and incubation temperature).

Moreover, in order to improve standardization of protocols, it would be important to evaluate pH effects on tolerance measurement. Indeed, in toxicity tests, pH values can vary between studies according to the used medium. In fact, pH strongly influence metal bioavailability and modify Cu effects on the periphyton (Serra *et al.* 2010). Likewise, it was shown that nutrients, in particular phosphorus, could limit Cu effects on periphyton because of the interaction between these two elements (i.e. competition) (Guasch *et al.* 2004). Thus, these observations raise question about the possible use of a standardized medium for tolerance measurements to limit possible changes in the bioavailability of toxicants (Tlili *et al.* 2015), that could led to a modification of PICT response.

3.4. Conclusions

This microcosm study highlighted that a 10°C temperature rise during the growth period of periphyton induced functional and structural effects on phototrophic communities, whatever the Cu exposure levels. Such effects led to an increase in their sensitivity to Cu especially in communities chronically exposed to this metal. It means that temperature greatly influenced the tolerance acquisition during the selection phase of the PICT approach. Conversely, the incubation temperature applied during short-term toxicity tests did not affect tolerance measurement, in the range of temperature tested (i.e. a difference in temperature of 5°C between growth and incubation temperature). However, more investigation is needed to

conclude on the influence of temperature incubation on tolerance measurement, especially in a context of higher differences in the temperatures applied during chronic exposure to Cu.

Globally, results of this study argue for more studies aiming at better assessing the impact of environmental factors, such as temperature, on PICT response. It could help to better distinguish the effects of toxicants from those resulting of these other parameters, which is one of the current challenge in PICT assessment.

4. Conclusions

Les résultats de la première étude (article 2) ont mis en évidence une très faible influence de la durée d'exposition, dans les tests de toxicité aiguë (2, 4 et 6 h), sur la mesure des niveaux de tolérance des communautés phototrophes de biofilm au Cu, exprimée en CE_{10} et CE_{50} , sur la base de l'inhibition de l'efficacité photosynthétique ($p > 0,05$).

En revanche, nous avons montré que la concentration de la suspension de biofilm, utilisée lors des tests de toxicité (évaluée par mesure de la concentration en chl *a* et du poids sec), est un paramètre crucial, qui conditionne les niveaux de tolérance au Cu mesurés. En effet, une régression linéaire positive significative a été observée entre le niveau de tolérance mesurée (CE_x) et la concentration de la suspension de biofilm, sur la base de la mesure des concentrations en chl *a* (pour la mesure de la CE_{50} : à 3 semaines, $r^2 = 0,92$, $p < 0,05$; à 5 semaines, $r^2 = 0,88$, $p < 0,05$). Néanmoins, la mesure des niveaux de tolérance au Cu est plus variable pour les concentrations plus élevées en suspension de biofilm (i.e. entre 7000 et 2300 $\mu\text{g chl } a \text{ L}^{-1}$). Ceci est majoritairement dû à la difficulté d'homogénéiser la suspension de biofilm, lorsque sa concentration est élevée ; ce qui induit une plus grande variabilité entre les réplicats analytiques, utilisés lors du test de toxicité aiguë.

En complément, nos résultats ont montré une variabilité des niveaux de tolérance au Cu avec le stade de maturation du biofilm (entre 3 et 5 semaines de croissance). Ainsi, la maturité du biofilm conditionne la pente de la régression linéaire observée entre les niveaux de tolérance et la concentration en suspension utilisée. Or, la maturité du biofilm découle des caractéristiques intrinsèques du biofilm, qui évoluent au cours de son développement (ex : développement de la matrice EPS, évolution de la composition des différents assemblages du biofilm) et qui sont fortement conditionnées par les paramètres physico-chimiques du milieu. Ainsi, de manière plus générale, les niveaux de tolérance dépendent des caractéristiques générales du biofilm considéré. La pente de la régression linéaire étant variable selon les caractéristiques du biofilm, il est difficile de concevoir une normalisation des données, *a posteriori*. Il nous apparaît donc plus rigoureux de standardiser *a priori* les concentrations en suspension de biofilm utilisées dans les tests de toxicité aiguë.

Ainsi, cette étude nous a permis d'optimiser les protocoles de tests de toxicité aiguë, utilisés afin d'évaluer les niveaux de tolérance des communautés phototrophes de biofilm au Cu, sur la base de la mesure de l'efficacité photosynthétique (Fig IV.11.). Nous avons décidé

de fixer une concentration en suspension de 2000 $\mu\text{g chl } a \text{ L}^{-1}$ (sur la base des mesures effectuées à l'aide du PhytoPam).

Enfin, compte tenu de l'absence d'effet significatif de la durée d'exposition sur la mesure des niveaux de tolérance au Cu des communautés phototrophes de biofilm, nous avons choisi 2 h (i.e. durée la plus courte testée) comme durée d'incubation optimale. En effet, il est primordial dans les approches PICT de privilégier des durées d'incubation courtes, lors des tests de toxicité, afin de limiter, autant que possible, les changements dans la communauté, qui pourraient modifier leur sensibilité au toxique et donc les niveaux de tolérance mesurés.

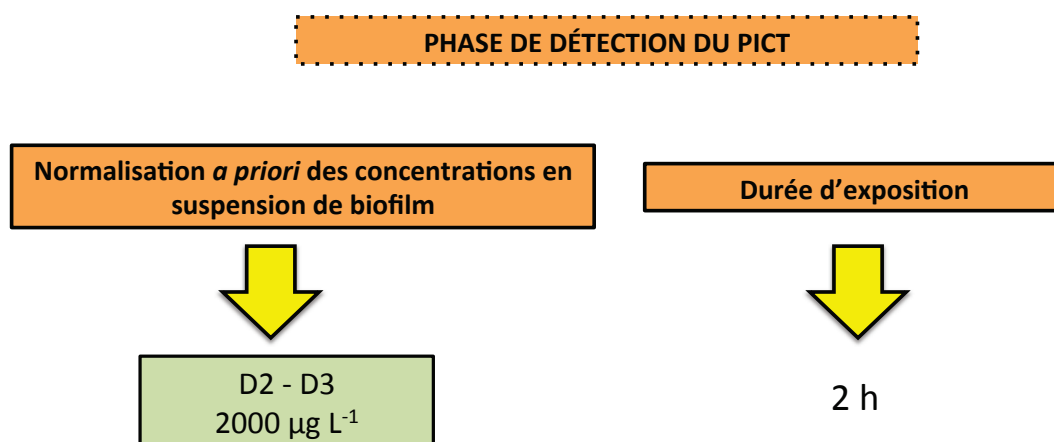


Figure IV.11. Protocole optimisé des tests de toxicité aiguë (phase de détection de l'approche PICT), permettant d'évaluer la sensibilité des communautés phototrophes de biofilm au Cu, sur la base de la mesure de l'efficacité photosynthétique. D, dilution de la suspension de biofilm.

Les résultats de la seconde étude (article 3) ont montré que la température d'incubation, durant l'exposition aiguë (i.e. variation de $\pm 5^{\circ}\text{C}$), n'avait pas d'incidence sur les niveaux de tolérance mesurés, dans la gamme de températures de croissance testée (i.e. 18 et 28°C). Cette gamme de températures correspond à celle testée dans l'étude du chapitre VI, qui vise à répondre à l'hypothèse d'une influence de la température sur la sensibilité des communautés phototrophes au Cu. Pour cette étude, nous avons donc choisi de réaliser les tests de toxicité à la température intermédiaire de 23°C . De cette manière, quel que soit le contexte d'exposition chimique et thermique testé, le protocole utilisé est identique, simplifiant ainsi la réalisation des tests de toxicité aiguë.

Les résultats de cette seconde étude ont également montré que l'augmentation de la température, durant la croissance du biofilm, affectait la structure et le fonctionnement des

communautés phototrophes, quel que soit le contexte d'exposition au Cu. Ces effets de la température sur la structure et le fonctionnement des communautés phototrophes ont entraîné une diminution des niveaux de tolérance des communautés phototrophes au Cu. Cependant, cette diminution était plus marquée pour les communautés phototrophes exposées au Cu (niveau de tolérance 30 fois plus faible à 28°C qu'à 18°C), que pour les communautés non exposées (niveau de tolérance 4 fois plus faible à 28°C qu'à 18°C). L'influence de la température sur l'acquisition de la tolérance au Cu des communautés phototrophes de biofilm sera discutée, plus en détails, dans les chapitres VI et VII.

En complément, des développements méthodologiques ont été réalisés afin d'évaluer le rôle de la MO d'origine microbienne sur l'exposition au Cu du biofilm, en vue de répondre à l'hypothèse d'une diminution de la bioaccumulation du Cu avec l'augmentation de la température. Ces développements sont décrits dans le chapitre suivant (i.e. Chapitre V).

Chapitre V

Développements méthodologiques en vue d'évaluer le rôle de la matière organique d'origine microbienne dans l'exposition des communautés de biofilm au cuivre: Influence de la matrice EPS

1. Contexte et objectifs des développements méthodologiques

La principale hypothèse proposée pour expliquer la diminution de la bioaccumulation du Cu avec l'augmentation de la température, observée lors de notre première étude (Chapitre III), était celle d'une augmentation de la complexation du Cu avec les substances polymériques extracellulaires (EPS), ces EPS étant sécrétés par le biofilm, sous forme d'exsudats algaux ou de matrice, dans le cadre de mécanisme de protection au Cu (voir Chapitre I, § 2.3.3.).

Dans les cours d'eau, même si les apports de MO sont majoritairement d'origine allochtone (i.e. issue de la production primaire de l'écosystème terrestre environnant et des sources en amont) (Robert *et al.*, 2005), les EPS constituent une source importante en MOD autochtone (i.e. issue de la production primaire au sein même de l'écosystème) (Flemming and Wingender, 2001), puisqu'elles représentent plus de 25% de l'apport total en MOD (Wilkinson *et al.* 1997). L'influence des EPS sur le devenir des métaux, dans les milieux aquatiques, est donc non négligeable (Bhaskar and Bhosle, 2006). Ainsi, compte tenu de leur rôle clé dans la spéciation et la biodisponibilité du Cu, et du développement plus important de la matrice EPS avec l'augmentation de la température observée par Di Pippo *et al.* (2012), nous avons posé l'hypothèse d'une augmentation de la complexation du Cu avec la matrice EPS lors de l'augmentation de la température ; une telle séquestration du Cu permet de protéger la cellule de l'internalisation du Cu et de sa toxicité. Afin de tester cette hypothèse, il était donc nécessaire d'appliquer un protocole d'extraction des EPS, en vue de mesurer les concentrations en Cu dans cette fraction du biofilm. Il était important de conserver, en parallèle, notre méthode interne (voir Chapitre II, § 2.2.2.), utilisée dans le cadre de la précédente étude du Chapitre III, qui permettait d'évaluer les concentrations en Cu total, mais aussi les concentrations en Cu « externalisé » et « internalisé ». Le couplage de ces deux méthodes offre, ainsi, une analyse plus complète de l'exposition des communautés de biofilm au Cu.

2. Stratégie expérimentale

Afin de mesurer les concentrations métalliques dans les EPS, nous avons choisi de nous appuyer sur une méthode d'extraction des EPS préalablement testée par Aguilera *et al.* (2008). L'étude d'Aguilera *et al.* (2008), réalisée sur des biofilms de rivière, avait pour but de comparer l'efficacité de quatre méthodes d'extraction de la matrice EPS, en vue de doser, *in fine*, les concentrations de différents métaux (i.e. Fe, Al, Cr, Co, Ni, Cu, Zn, As, Cd et Pb), dans deux fractions d'EPS distinctes, à savoir :

- la fraction colloïdale, qui correspond aux EPS faiblement liées à la cellule,
- et la fraction capsulaire, qui regroupe les EPS fortement liées à la cellule (voir Chapitre I, § 2.3.3.).

Dans cette étude, les différentes méthodes d'extraction d'EPS ont été comparées et ont permis de confirmer qu'il n'existe pas de méthode universelle pour l'extraction de la matrice EPS, ce constat étant largement souligné par bon nombre d'auteurs (ex : Liu and Fang, 2002 ; Comte *et al.* 2006 ; D'Abzac *et al.* 2010). En effet, la quantité et la composition de la matrice EPS extraite dépendent fortement de la méthode utilisée. Liu and Fang (2002) ont montré, par exemple, que les quantités d'EPS obtenues variaient entre 26 mg (centrifugation seule) et 165 mg (extraction à l'EDTA), selon la méthode d'extraction appliquée. Ils ont ainsi mis en évidence les conséquences du manque de standardisation de la procédure et donc l'impossibilité de comparer les résultats entre études. De plus, selon la méthode d'extraction appliquée, une lyse cellulaire plus ou moins importante peut se produire, entraînant ainsi une incertitude sur la fraction des EPS obtenue. Ainsi, il est important que la méthode utilisée confère un bon compromis entre lyse cellulaire et rendement d'extraction de la matrice EPS. Aguilera *et al.* (2008) suggèrent donc d'utiliser différentes méthodes d'extraction des EPS, afin de prendre en compte cette incertitude. Cependant, au regard de la quantité de biomasse nécessaire (i.e. 1,5 g de biofilm lyophilisé) pour réaliser ces extractions, il n'a pas été possible d'appliquer plusieurs méthodes d'extraction dans notre étude. Nous nous sommes donc focalisés sur le choix de la méthode d'extraction qui conférerait le meilleur compromis entre lyse cellulaire et rendement d'extraction des EPS.

Ainsi, dans l'étude d'Aguilera *et al.* (2008), cinq méthodes d'extraction ont été comparées. Trois méthodes d'extraction reposaient sur l'utilisation d'agents extractants, tels que : de l'eau Ultrapure MilliQ[®], une solution de NaCl à 20 g L⁻¹ et une solution d'EDTA (agent chélatant) à 10 mM, et deux méthodes d'extraction reposaient sur l'utilisation de

résines échangeuses de cations : Dowex et Crown ether. Les résultats obtenus ont montré une efficacité d'extraction similaire entre toutes les méthodes testées. Cependant, les méthodes utilisant l'EDTA ou le NaCl ont permis d'extraire une proportion en carbohydrates plus élevée. Or, ces carbohydrates sont les principaux groupes fonctionnels impliqués dans la fixation des métaux (voir Chapitre I, § 2.3.3.). Ainsi, l'utilisation de l'EDTA ou du NaCl permet d'extraire des concentrations métalliques un peu plus élevées. De cette manière, les auteurs ont suggéré que les concentrations en Cu mesurées dans les EPS reflétaient plus justement les concentrations mesurées dans le milieu. La méthode d'extraction qui repose sur l'utilisation de l'EDTA conférait, de plus, un bon compromis entre extraction et lyse cellulaire, au vu des concentrations utilisées (i.e. concentration en EDTA réduite à 10 mM, soit 10 fois moins élevée que celle appliquée pour l'extraction des métaux sur du matériel biologique marin).

Au regard de ces résultats, nous avons donc choisi d'appliquer la méthode d'extraction à l'EDTA (10 mM). De plus, cette méthode se rapproche de la méthode interne appliquée, puisque celle-ci repose sur le même agent extractant, mais utilisé à une concentration plus faible (4 mM). De cette manière, le couplage de ces deux méthodes semble approprié.

Le protocole complet, décrit dans l'étude d'Aguilera *et al.* (2008), est le suivant :

- Lyophilisation de la suspension de biofilm
- Ajout de 5 mL d'eau déminéralisée au biofilm préalablement lyophilisé (1,5 g poids sec)
- Agitation (20 - 30 rpm), pendant 20 minutes, à température ambiante
- Centrifugation (4000 g), pendant 15 minutes, à température ambiante
- Récupération du surnageant, correspondant à la **fraction colloïdale**
- Ajout de 5 ml d'EDTA (concentration finale de 10 mM)
- Agitation (20 - 30 rpm), pendant 3 h, à température ambiante
- Centrifugation (16000 g), pendant 20 minutes, à température ambiante
- Récupération de la suspension, correspondant à la **fraction capsulaire**

Dans ce protocole, la fraction EPS colloïdale est récupérée suite à l'incubation du biofilm avec de l'eau déminéralisée. L'ajout, dans un second temps, de l'EDTA (10 mM, 3 h) au culot conservé permet de récupérer la fraction EPS capsulaire, qui correspond aux EPS fortement liés aux cellules microbiennes (Fig V.1.). Cela permet donc de mesurer les concentrations métalliques dans cette fraction.

Dans notre méthode interne, qui repose sur la filtration d'un échantillon frais et non pas sur une série de centrifugation d'un échantillon lyophilisé (remis en suspension par un agent chélateur, tel que l'eau déminéralisé ou l'EDTA), l'EDTA, utilisé à une concentration de 4 mM avec un temps de contact de 10 min, permet d'éliminer la fraction dite « externalisée » (Fig V.1.). Ainsi, après traitement à l'EDTA, filtration et minéralisation de l'échantillon, seule la concentration en Cu dans la fraction dite « internalisée » est mesurée.

En parallèle, la filtration et la minéralisation de l'échantillon sans ajout d'EDTA, permet de mesurer la concentration en Cu dans la fraction totale. Ainsi, en soustrayant la concentration en Cu totale de la concentration en Cu dit « internalisé », il est possible de calculer la concentration en Cu dans la fraction dite « externalisée » (voir Chapitre II, § 2.2.2.). Il est également possible de mesurer directement la concentrations en Cu dans cette dernière fraction en analysant le Cu dans l'éluat, récupéré après l'extraction à l'EDTA.

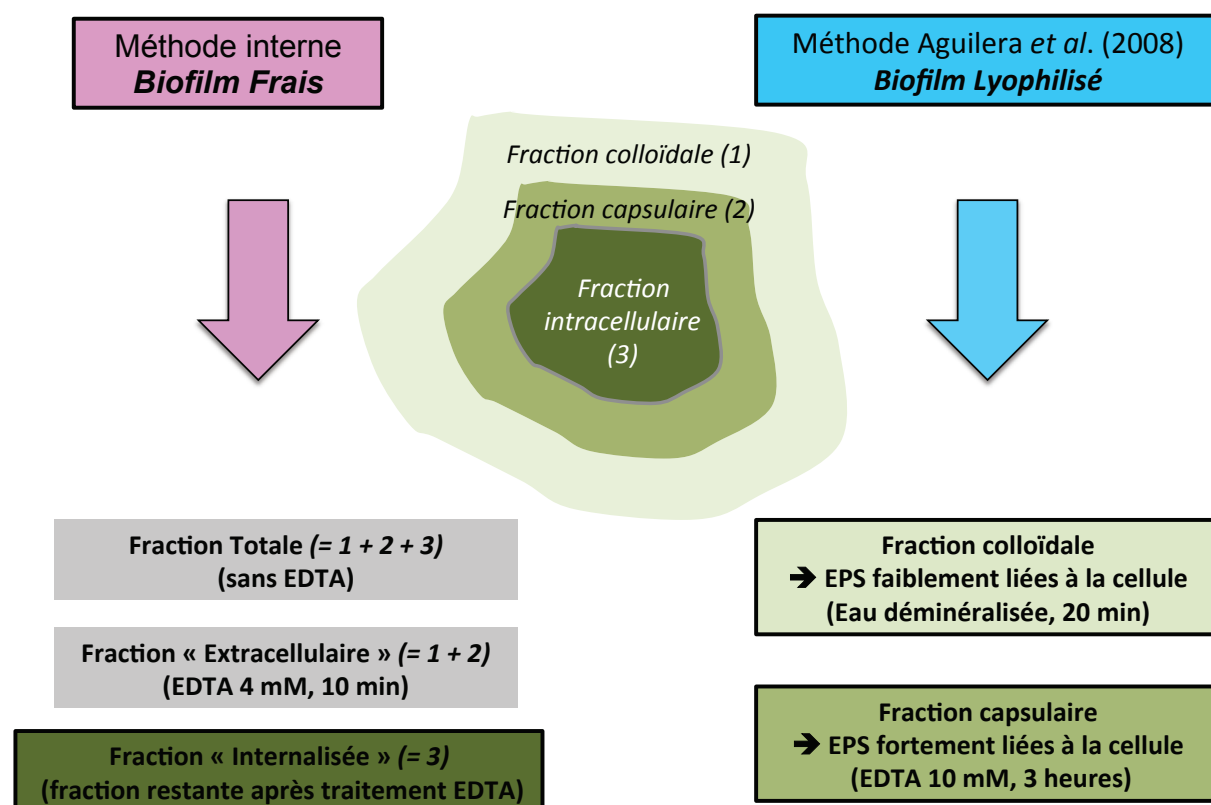


Figure V.1. Comparaison de la méthode décrite dans l'étude d'Aguilera et al. (2008) et de la méthode interne.

Afin de pouvoir coupler les deux méthodes, en vue d'évaluer de manière plus complète la bioaccumulation du Cu, il était intéressant de comparer la fraction dite « externalisée » obtenue avec la méthode interne et les fractions colloïdales et capsulaires, obtenues avec la méthode décrite dans l'étude d'Aguilera et al. (2008), ces trois fractions, par

définition, étant susceptibles de se recouper. Cependant, afin de pouvoir interpréter correctement les concentrations en Cu dans les différentes fractions du biofilm, obtenues avec ces deux méthodes, il était nécessaire d'évaluer au préalable (i) l'influence possible de l'état de la suspension de biofilm utilisé (lyophilisé ou frais) et (ii) l'influence possible des concentrations en EDTA, sur la mesure des concentrations en Cu. Ainsi, afin de tester le premier point, la méthode interne, réalisée à partir de biofilm frais (Protocole 1), a été comparée à la méthode interne, réalisée sur biofilm lyophilisé (Protocole 2). Concernant le second point, celui-ci a été testé en comparant le protocole décrit dans l'étude d'Aguilera *et al.* (2008), réalisé à une concentration en EDTA de 10 mM, avec un temps de contact de 3 h (Protocole 4), à ce même protocole, mais dit « adapté », puisque réalisé à une concentration en EDTA de 4 mM (i.e. concentration identique au Protocole 1), mais en conservant toutefois un temps de contact identique de 3 h (Protocole 3). Les quatre protocoles testés sont schématisés sur la figure V.2.

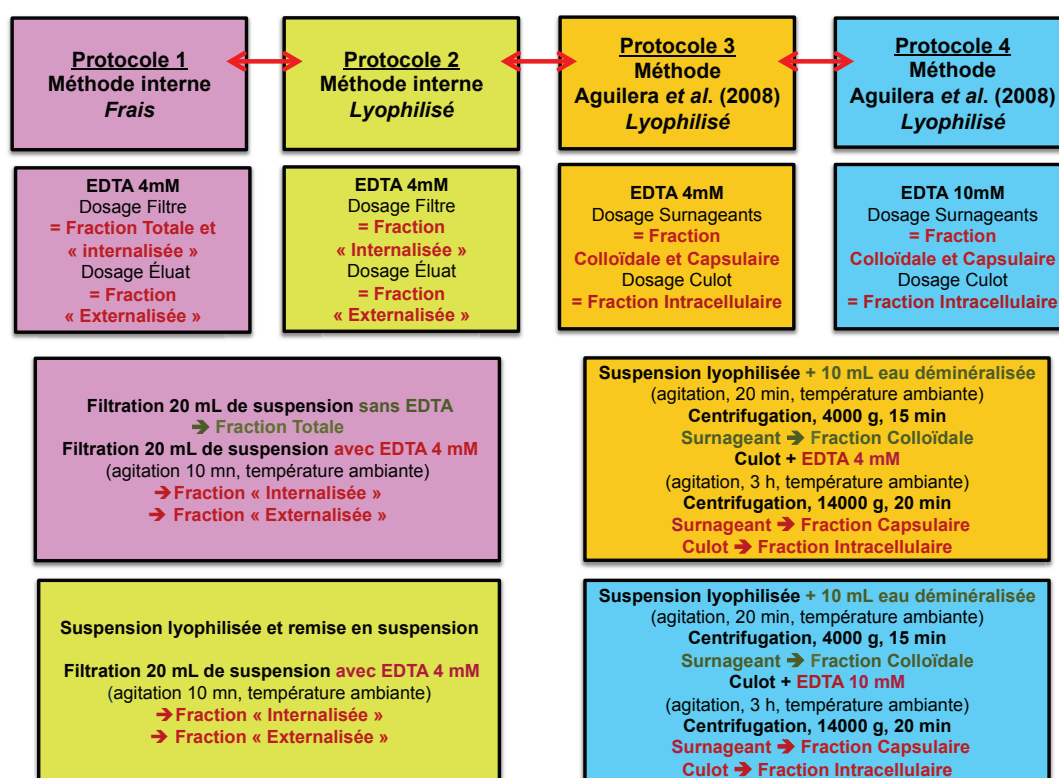


Figure V.2. Description des 4 protocoles, testés au cours de développements méthodologiques. Les deux doubles flèches rouges soulignent les comparaisons, deux à deux, des protocoles 1 et 2 et des protocoles 3 et 4.

Afin de comparer ces 4 protocoles deux à deux, des microcosmes de laboratoire ont été inoculés avec une suspension de biofilms prélevés en amont de la rivière Morcille (voir Chapitre II, § 1.1. et § 1.2.). Les microcosmes, contaminés en Cu à une concentration proche

de $15 \mu\text{g L}^{-1}$, ont été mis en place en triplicats et soumis à température ambiante ($\sim 20^\circ\text{C}$). L'eau reconstituée, utilisée dans cette expérimentation (i.e. mélange 1:4 d'eau de forage et d'eau déminéralisée ; Chapitre II, § 1.2.2.) a été supplémentée en différents nutriments, à des concentrations proches de celles mesurées dans la rivière Morcille (voir Chapitre II, § 1.2.2) et renouvelée chaque semaine. Les EPS ont été extraits, après 5 semaines de développement du biofilm, afin de mesurer les concentrations en Cu dans la fraction dite « externalisée » (Protocoles 1 et 2) ou dans les deux fractions EPS obtenues (i.e. colloïdale et capsulaire ; Protocoles 3 et 4) et dans la fraction intracellulaire (Protocoles 1 à 4). La figure V.3. présente le calendrier expérimental suivi.

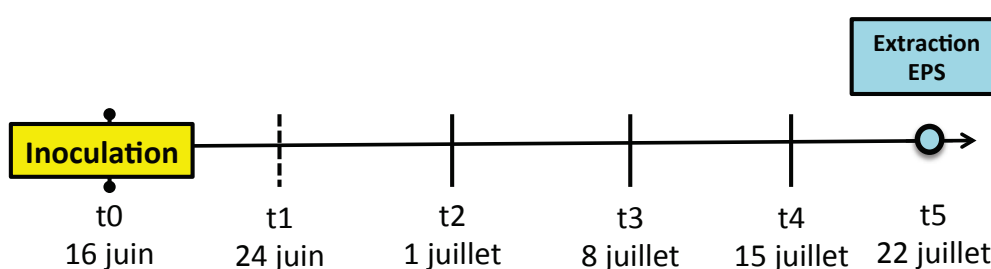


Figure V.3. *Calendrier expérimental.* Le point bleu représente le point de prélèvement du biofilm en vue d'analyser le Cu dans les différentes fractions du biofilm (Cu lié aux EPS et Cu intracellulaire). Le changement d'eau est représenté par un trait vertical noir plein. Le trait vertical noir, en pointillés, marque l'absence de changement d'eau.

3. Développement d'une méthode d'analyse des concentrations en cuivre complexé avec la matrice EPS et internalisé

La figure V.4. présente, pour les 4 protocoles testés, les concentrations en Cu mesurées dans les différentes fractions du biofilm. Des concentrations en Cu similaires ont été mesurées dans la fraction totale pour les quatre protocoles testés (comprises entre 177 et 193 $\mu\text{g g}^{-1}$ ps ; concernant les protocoles 3 et 4, la fraction totale correspond à la somme des trois fractions mesurées). La comparaison des résultats issus des Protocoles 1 (Fig V.4.A.) et 2 (Fig V.4.B.) montre que les concentrations en Cu sont similaires entre les échantillons frais et ceux préalablement lyophilisés, quelle que soit la fraction considérée. De même, la comparaison des résultats issus des Protocoles 3 (Fig V.4.C.) et 4 (Fig V.4.D.), montre que les concentrations en EDTA utilisées n'ont pas d'influence sur la mesure des concentrations en Cu, quelle que soit la fraction considérée.

En revanche, la comparaison de notre méthode interne (Protocole 1) à la méthode issue de l'étude d'Aguilera *et al.* (2008) (Protocole 3), montre que les concentrations en Cu mesurées dans la fraction dite « externalisée » étaient similaires aux concentrations en Cu mesurées dans la fraction colloïdale, suggérant ainsi que ces deux fractions – *a priori* définies différemment opérationnellement - sont en fait identiques (Fig V.4.). Par conséquent, la méthodologie interne, utilisée jusqu'alors, ne permet qu'une mesure des concentrations en Cu au sein de la fraction d'EPS faiblement liées à la cellule, et non pas une mesure complète des concentrations en Cu de la fraction externalisée. Par déduction, la fraction dite « internalisée », obtenue avec ce même Protocole 1, comprend à la fois les concentrations en Cu mesurées dans la cellule (i.e. fraction intracellulaire) et les concentrations en Cu mesurées dans la fraction d'EPS fortement liées à la cellule (i.e. capsulaire). Ceci est confirmé au regard des résultats (Fig V.4.) puisque la concentration moyenne en Cu obtenue en additionnant celle mesurée dans la fraction intracellulaire et celle mesurée dans la fraction capsulaire à partir du Protocole 3 ($168 \pm 6 \mu\text{g g}^{-1}$ ps) est similaire à la concentration moyenne en Cu mesurée à partir du Protocole 1 dans la fraction internalisée ($158 \pm 25 \mu\text{g g}^{-1}$ ps).

Dans le cadre de la méthode interne, il est donc plus juste de parler de fraction adsorbée (ou échangeable) que de fraction externalisée. Comme nous avons montré précédemment que la concentration en EDTA (4 mM et 10 mM) n'avait pas d'influence sur la mesure des concentrations en Cu dans la fraction capsulaire, nous pouvons en déduire que la non-extraction de cette fraction capsulaire avec la méthode interne est due à un temps d'exposition trop court à l'EDTA 4 mM (10 min au lieu de 3 h dans le Protocole 3). De même, il n'est pas

justifié de parler de fraction dite « internalisée », puisque celle-ci regroupe la fraction internalisée et la fraction capsulaire.

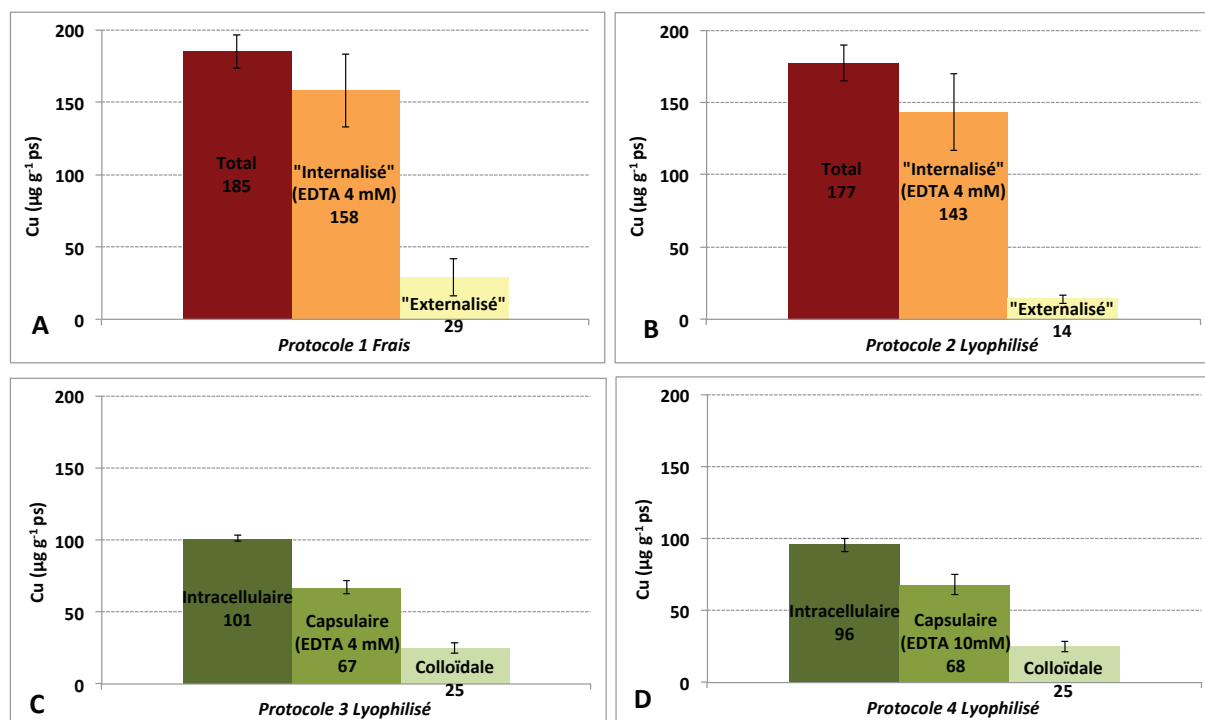


Figure V.4. Concentrations moyennes en Cu ($\mu\text{g g}^{-1} \text{ps}$; $n=3$) mesurées dans les différentes fractions ciblées, obtenues selon le protocole 1 (A), le protocole 2 (B), le protocole 3 (C) et le protocole 4 (D).

Ainsi, d'après l'ensemble des résultats obtenus, le Protocole 3, adapté de l'étude d'Aguilera *et al.* (2008), permet de mesurer les concentrations en Cu dans les différentes fractions du biofilms (Fig V.5.), à savoir :

- les deux fractions de la matrice EPS (colloïdale et capsulaire), ce qui permet d'évaluer la capacité de la matrice EPS à séquestrer le Cu et à protéger ainsi la cellule de la toxicité métallique, et
- la fraction intracellulaire, qui permet d'appréhender la toxicité métallique.

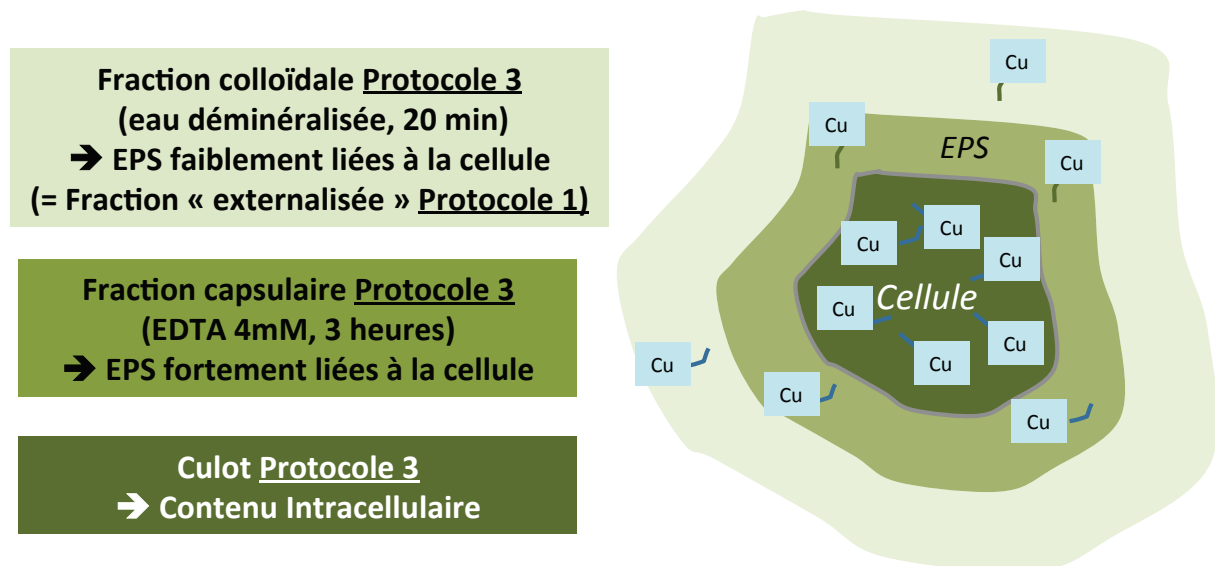


Figure V.5. Schématisation des différentes fractions du biofilm dans lesquelles sont mesurées les concentrations en Cu, à l'aide du Protocole 3.

Nous avons donc utilisé cette méthodologie dans la suite de nos travaux (Chapitre VI), afin de mieux appréhender l'influence des conditions thermiques sur l'exposition des communautés de biofilm au Cu. Ce protocole est décrit en détail dans l'article 4, inclus dans ce chapitre.

Chapitre VI

Influence de la température sur la sensibilité et
l'exposition des communautés de biofilm au
cuivre : comparaison de la réponse des
communautés phototrophes et hétérotrophes

1. Introduction

Dans le cadre de l'étude du chapitre III, qui visait à appréhender l'influence d'une augmentation de la température sur la réponse au Cu de communautés phototrophes de biofilm, prélevées en hiver, deux hypothèses ont été posées pour expliquer la réduction des effets observés du Cu avec la hausse thermique. En effet, suite à la modification de la composition des assemblages de diatomées observée, nous avons suggéré un recrutement d'espèces co-tolérantes au Cu et à la température (hypothèse 1). Cependant, le lien entre le changement de structure des assemblages de diatomées et la diminution de la sensibilité des communautés phototrophes au Cu n'a pas pu être directement établi, puisque ce niveau de sensibilité n'a pas été évalué. De plus, au vu de la diminution de la bioaccumulation du Cu observée, nous avons supposé que l'augmentation de la température diminuait l'exposition des communautés de biofilm au Cu (hypothèse 2).

Dans ce chapitre, constitué d'une publication en préparation, en vue d'une soumission dans la revue *Environmental Pollution* (article 4), nous proposons de valider ou d'infirmer les hypothèses posées. Pour cela, des biofilms naturels prélevés en fin d'été (septembre 2014) au niveau de la section amont de la rivière Morcille, dans une eau à 18°C, ont été soumis pendant 4 semaines à 3 niveaux thermiques (18, 23 et 28°C), en présence ou non de Cu, à une concentration proche de celles retrouvées ponctuellement dans la section aval de ce cours d'eau (~15 µg/L). La réponse structurale et fonctionnelle des communautés phototrophes de biofilm a été évaluée, durant tout le suivi, par mesure de la biomasse algale et de l'efficacité photosynthétique.

Pour tester la 1ère hypothèse, nous avons choisi d'appréhender finement le lien entre les modifications potentielles de la composition des assemblages de diatomées, qui représentent la composante dominante au sein du compartiment phototrophe des biofilms étudiés, et le niveau de sensibilité global des communautés phototrophes au Cu. Deux questions ont ainsi été abordées :

- La température influence-t-elle la sensibilité au Cu de communautés phototrophes qui n'ont pas été préalablement exposées à ce toxique ?

- i.e. modifie-t-elle leur vulnérabilité en altérant leur capacité à tolérer une exposition au Cu ?

- La température influence-t-elle la sensibilité au Cu de communautés phototrophes exposées chroniquement à ce toxique ?

➔ i.e. modifie-t-elle leur capacité d'adaptation en terme d'acquisition de tolérance au Cu, dans le cadre du concept « PICT » (Pollution-Induced community tolerance) ?

Ces investigations se sont appuyées sur les développements méthodologiques décrits dans le chapitre V.

Pour tester la seconde hypothèse et appréhender, ainsi, l'influence de la température sur l'exposition des communautés de biofilm au Cu, la bioaccumulation de ce métal a été évaluée, en fin de suivi (4 semaines). Pour ce faire, nous avons intégré la méthodologie préalablement développée dans l'étude du chapitre V, permettant de mesurer les concentrations en Cu dans la fraction internalisée, responsable de la toxicité cellulaire, ainsi que dans les fractions EPS, impliquées dans la protection de la cellule de l'internalisation du Cu.

En parallèle, nous avons choisi, dans cette étude, d'aborder la question de l'influence de la température sur les niveaux de sensibilité des communautés périphytiques hétérotrophes au Cu, afin d'appréhender si l'influence de la température sur les niveaux de sensibilité à ce métal s'exerçait de manière comparable sur les communautés phototrophes et hétérotrophes.

De plus, le fait d'utiliser des biofilms prélevés en fin d'été a permis d'aborder la question de la saisonnalité dans leur réponse au contexte multistress étudié. En effet, nous avons pu ainsi comparer l'influence de la température sur les effets du Cu sur des communautés phototrophes prélevés à deux périodes distinctes de l'année (i.e. biofilm d'hiver, Chapitre I et biofilm de fin d'été, présent Chapitre)

En complément des résultats décrits dans l'article 4, nous avons aussi évalué l'influence de la température sur la réponse génétique du biofilm au Cu, afin d'appréhender l'influence de ce paramètre environnemental sur la mise en place de stratégies et de mécanismes d'adaptation à l'exposition chronique au Cu, spécifiques aux assemblages diatomiques et bactériens. Les résultats exploratoires sont décrits à la fin de ce présent Chapitre.

2. A PICT approach to assess the influence of temperature on the sensitivity of phototrophic and heterotrophic periphytic communities to copper.

En préparation pour la revue Environmental Pollution

Anne Sophie Lambert¹; Aymeric Dabrin¹; Soizic Morin²; Bernadette Volat¹; Arnaud Foulquier^{1,3}; Marina Coquery¹; Stéphane Pesce¹

1. Irstea, UR MALY, Centre de Lyon-Villeurbanne, 5 rue de la Doua, CS 70077, 69626 Villeurbanne Cedex, France
2. Irstea, UR EABX, Centre de Bordeaux, 33612 Cestas, France.
3. Laboratoire d'Écologie Alpine - UMR CNRS 5553, Université Grenoble Alpes, BP 53, 38041 Grenoble Cedex 9, France

Abstract

In lotic ecosystems, periphyton ensures key ecological functions such as primary production and nutrient cycling. In streams subjected to metallic pollutions, dissolved metals such as copper (Cu) can functionally impair phototrophic and heterotrophic communities and impact their structure. Such effects at community level can ultimately increase community tolerance to Cu, according to the concept of pollution-induced community tolerance (PICT). However, driving increase in extreme climate events and especially sharp temperature rises can influence periphyton community tolerance to Cu. In this context, we proposed to assess in a microcosm study the influence of a temperature increase (+5°C and +10°C) on the sensitivity of both phototrophic and heterotrophic periphytic communities to Cu, according to their history of chronic exposure to this metal (i.e. Control and Cu-exposed communities). Chronic Cu-exposure induced significant changes in the diatom composition without major difference between temperatures. Conversely, the temperature increase affected diatom assemblage structure of non-Cu-exposed phototrophic communities. Nevertheless, temperature had very limited and transitory effects on the Cu-tolerance level of both exposed and non-exposed phototrophic communities. In the same way, temperature had no effect, or only a slight but significant negative effect, on Cu-tolerance levels of Cu-exposed heterotrophic communities determined from bioassays targeting β -glucosidase (β -Glu) and leucine amino peptidase (Lap) activities, respectively. In contrast, tolerance levels determined from the same extracellular enzymatic activities revealed a strong influence of temperature on the sensitivity of non-Cu-exposed heterotrophic communities towards Cu. However, the direction of the temperature influence on the measured sensitivity levels was variable according to the kind of the enzymatic activity and CE_{50} values obtained from β -Glu and Lap bioassays were respectively significantly enhanced or reduced with increasing temperatures. Such results suggest that changes in temperature can modify the capacity of non-Cu-exposed communities

to tolerate subsequent Cu exposure. However, the influence of temperature on biofilm tolerance to Cu can greatly vary according to the microbial compartment studied (i.e. phototrophic or heterotrophic), and the measured functional parameters.

Keywords: Bioaccumulation; Biofilms; Extracellular enzymatic activities; Freshwater; Microbial ecotoxicology; Multi-stress; Photosynthesis; Pollution induced community tolerance.

2.1. Introduction

Despite the development of more sustainable industrial and agricultural practices, surface freshwaters are still highly affected by metal pollution (Luoma and Rainbow, 2008). Among metals, copper (Cu) is ubiquitously present in such environments as a result of natural and anthropogenic processes, including widespread use as a fungicide and weed-killer in both conventional and organic agriculture (Serra and Guasch, 2009; Provenzano *et al.* 2010). Copper is an essential micronutrient for organisms due to its role in redox reaction catalysis, electron transport, nucleic acid metabolism and various enzymatic activities (Scheinberg, 1991). Nevertheless, at high concentrations it becomes highly toxic for many aquatic organisms (Knezovich *et al.* 1981). The toxic potential of Cu is illustrated by its predicted no-effect concentration (PNEC) in water, which is set at 7.8 $\mu\text{g L}^{-1}$ in the EU (Van Sprang *et al.* 2007) but only at 1.6 $\mu\text{g L}^{-1}$ in France (INERIS, 2015).

In lotic ecosystems, including agricultural streams, periphyton (or ‘biofilms’) provides key ecological functions, like primary production and nutrient recycling (Battin *et al.* 2003). They are composed of phototrophic and heterotrophic microbial communities (including microalgae, bacteria, fungi and heterotrophic protists) embedded in a polysaccharide–protein matrix. Those microbial communities quickly interact with dissolved chemicals (Sabater *et al.* 2007), including Cu. Indeed, chronic exposure to Cu can functionally impair phototrophic and heterotrophic communities by reducing photosynthetic (Lambert *et al.* 2012; Soldo and Behra 2000) and extracellular enzymatic (Fechner *et al.* 2010) activities. It can also impact community structure following changes in the microbial biomass, the distribution of algal classes and taxonomic composition of diatom communities (Morin *et al.* 2012b; Serra and Guasch 2009), and shifts in bacterial diversity (Barranguet *et al.* 2002 ; Tlili *et al.* 2010 ; Lambert *et al.* 2012). Such adverse effects at community level can ultimately increase community tolerance to Cu (Soldo and Behra 2000; Tlili *et al.* 2010), according to the concept of pollution-induced community tolerance (PICT), first introduced by Blanck and Wängberg (1988).

In a context of climate change, driving an increase in extreme climate events (Beniston *et al.* 2007; Orłowsky and Seneviratne, 2012; Smith, 2011), acute temperature changes may prove to be an additional environmental stressor for freshwater microbial communities (Larras *et al.* 2013). Thus, a temperature increase can modify the response of microbial communities to chronic exposure to Cu (Boivin *et al.*, 2005; Lambert *et al.* submitted). Indeed, at heterotrophic community scale, Boivin *et al.* (2005) observed that periphytic bacterial

communities growing at 20°C under chronic Cu exposure were 6-fold more tolerant to Cu than communities growing at 10°C, due to the possible influence of temperature on Cu bioavailability and/or the bacterial sensitivity to this metal. Interestingly, Faburé *et al.* (2015) also showed a tendency toward lower Cu tolerance levels during the colder seasons (spring and winter) for bacterial communities of river periphyton chronically exposed to this metal in the field. Studying the influence of temperature (from 8°C to 23°C) on the response of phototrophic periphytic communities to a 6-week Cu exposure (nominal concentration of 15 µg L⁻¹), Lambert *et al.* (submitted) also showed that temperature increase reduced Cu effects on community structure and photosynthetic efficiency. The authors postulated that this was due to a reduction in Cu exposure at higher temperatures with a decrease in its bioaccumulation and also to a possible co-tolerance phenomenon between temperature and Cu, leading to the selection of more Cu-tolerant diatom species under temperature increase. These results differed from another recent study which revealed in a PICT approach that phototrophic periphytic communities exposed for 5 weeks to 60 µg Cu L⁻¹, became more sensitive to Cu when temperature increased from 18°C to 28°C (Lambert *et al.* in prep). Taken together, these studies suggest that the magnitude and the direction of the influence of temperature on the acquisition of microbial tolerance towards Cu probably depends on various parameters such as the studied communities (i.e. phototrophic or heterotrophic microorganisms), the initial community composition and the sensitivity of the most thermotolerant species towards Cu, as well as the stress conditions (e.g. Cu concentrations, exposure duration, range of temperatures...).

In this context, research is still needed to better understand the mechanisms which drive the influence of temperature on periphyton community sensitivity to Cu. Accordingly, we designed a microcosm approach to assess the influence of temperature on sensitivity of both phototrophic and heterotrophic periphyton, according to their history of chronic exposure to Cu. Natural periphyton communities were submitted for 4 weeks to three different temperatures (18, 23 and 28°C) in microcosms contaminated (about 15 µg L⁻¹) or not with Cu. The sensitivity levels to Cu were measured using a PICT approach based on bioassays targeting phototrophic (photosynthetic activity) and heterotrophic (extracellular enzymatic activities) microbial functions. In addition, we assessed structural changes in periphyton by measuring algal biomass and photosynthetic efficiency and by performing diatom taxonomic analysis. We hypothesized that the increase in temperature could modify microbial community structure, thus leading to changes in the capacity of phototrophic and heterotrophic communities to tolerate Cu. Accordingly, two main questions were addressed in

this study: i) Could temperature influence the sensitivity to Cu of Control communities to this metal, thus modifying their capacity to tolerate subsequent exposure? ii) Could temperature influence Cu-induced community tolerance during Cu chronic exposure?

2.2. Material and Methods

2.2.1. Experimental setup

The microcosm experiment was carried out in September 2014 using 18 independent glass aquariums (40×20×25 cm) incubated in three polyethylene tanks (250 L, 121 × 81 × 33 cm) containing water thermoregulated at 18°C (which was close to the average seasonal temperature of the Morcille river water during the initial periphyton sampling), 23°C and 28°C, respectively. In each tank, 6 microcosms were filled with reconstituted water consisting of 3:1 (v/v) distilled water:groundwater, supplemented with nutrients in order to adjust the conductivity (i.e. about 180 $\mu\text{S cm}^{-1}$) and nutrient concentrations (i.e. 15 mg L^{-1} of silica; 8 mg L^{-1} of nitrates; 0.2 mg L^{-1} of phosphates) to the characteristics of the river water at the periphyton sampling site (Table VI.1.). Water mixing, oxygenation and lighting were operated as previously described in Lambert *et al.* (2015). Three microcosms were used as “Control” microcosms (without Cu addition) and three “Cu-exposed” microcosms were supplemented with $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ to obtain a Cu concentration close to the highest concentrations recorded in the downstream section of Morcille River (i.e. about 15 $\mu\text{g Cu L}^{-1}$; Montuelle *et al.* 2010). To avoid Cu adsorption by the experimental equipment during the exposure period, Cu microcosms (including glass slides and pumps) were contaminated using the same Cu concentration for 24 hours before the start of the experiment. All the microcosms were filled with uncolonized artificial substrates (glass slides) to allow periphyton settlement during the experiment.

	Initial conditions (after water renewal)		Conditions after 1 week (before water renewal)					
			18°C		23°C		28°C	
	All aquariums (n=18)		Control (n=3)	Cu (n=3)	Control (n=3)	Cu (n=3)	Control (n=3)	Cu (n=3)
pH	9.0 ± 0.1		8.9 ± 0.4	9.4 ± 0.4	9.0 ± 0.4	9.0 ± 0.7	8.9 ± 0.3	8.9 ± 0.4
Conductivity (µS cm ⁻¹)	130 ± 6		118 ± 17	110 ± 17	113 ± 12	122 ± 23	118 ± 13	120 ± 22
DO (mg L ⁻¹)	9.25 ± 0.69		10.65 ± 0.30	11.04 ± 0.62	9.84 ± 0.40	10.24 ± 0.85	9.39 ± 0.38	9.83 ± 0.81
DOC (mg L ⁻¹)	0.58 ± 0.24		2.22 ± 0.41	1.89 ± 0.37	2.08 ± 0.50	1.88 ± 0.50	2.13 ± 0.47	1.73 ± 0.46
NO ₃ (mg L ⁻¹)	5.81 ± 0.45		1.28 ± 0.43	1.10 ± 0.20	1.30 ± 0.51	2.01 ± 1.57	1.57 ± 0.87	1.66 ± 1.61
NO ₂ (mg L ⁻¹)	<0.05		<0.05	<0.05	0.06 ± 0.01	0.14 ± 0.14	0.06 ± 0.02	0.14 ± 0.16
NH ₄ (mg L ⁻¹)	0.03 ± 0.04		0.05 ± 0.10	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02
PO ₄ (mg L ⁻¹)	0.15 ± 0.05		<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10
SiO ₂ (mg L ⁻¹)	5.53 ± 0.33		0.64 ± 0.55	2.27 ± 1.75	0.91 ± 0.67	1.89 ± 1.52	1.47 ± 1.00	4.11 ± 2.25

Table VI.1. *Physico-chemical characteristics of water in the 6 tested conditions before (conditions after 1 week) and 2 h after (initial conditions) each water renewal during 4 weeks (mean values of weekly samples ± standard deviation, s.d.; n=3). DO, dissolved oxygen; DOC, dissolved organic carbon.*

Just prior the experiment, stones were collected at the reference upstream site of Morcille River (Beaujolais, Eastern France, see Montuelle *et al.* (2010) for details). The periphyton was scraped and suspended in the river water in order to obtain a periphytic inoculum, which was homogenized before being added at the start of the experiment (week 0), in equal volumes, in all microcosms.

This study was conducted for 4 weeks. After one week, the water level of each aquarium was adjusted and each nutrient was added to maintain the initial trophic conditions. Then, water was renewed weekly to maintain Cu exposure and avoid nutrient depletion. From week 2 to week 4, the main physical-chemical parameters of the water were measured in each microcosm before and 2 h after each water renewal. Conductivity, pH and dissolved oxygen concentrations were measured using portable meters (WTW, Germany). Water samples were collected at the same time for subsequent laboratory analyses. Water temperature was recorded every hour with data loggers (HOBO® Pendant Temperature/Light, Prosensor). Water temperatures in the microcosms were close to target ones with measured mean values of 18.3°C (± 0.2), 23.5°C (± 0.3) and 28.0°C (± 0.2), respectively, without significant difference between Control (i.e. without Cu addition) and Cu microcosms (data not shown).

2.2.2. Chemical analyses

Standard operating procedures were followed to determine the water concentrations of orthophosphates (PO_4 ; NF EN ISO 6878), nitrates (NO_3 ; NF EN ISO 10304), nitrites (NO_2 ; NF EN 26777), ammonium (NH_4 ; NF T 90-015-2), silicium dioxide (SiO_2 ; NF T 90-007) and dissolved organic carbon (DOC; NF EN 1484).

2.2.3. Analysis of copper in water and in periphyton

From week 2 to week 4, total dissolved Cu concentrations were controlled weekly, before and after water change. Channel water (30 mL) was sampled, filtered (0.45 μm polyvinylidene difluoride [PVDF], Whatman), acidified to 0.5% (v/v) with nitric acid (14 M Suprapur, Merck), and stored at 4°C until analysis.

Cu concentrations in Cu-exposed periphyton were determined at week 4 following a protocol adapted from Aguilera *et al.* 2008. Periphyton was scraped from glass substrates and resuspended in the same medium that those of microcosms. 30 mL of suspension were used to

determine the concentrations of Cu (i) adsorbed on the colloidal fraction (ii) in the capsular fraction of the biofilm exopolymeric substances (EPS) and (iii) in the intracellular fraction of periphyton. After the lyophilisation of the periphyton suspension, 10 mL of demineralized water were added to the suspension which was shaken during 20 min at ambient temperature and centrifuged (4000 g, 15 min) to retrieve the supernatant to assess Cu in the colloidal fraction. Then, the pellet was incubated with EDTA (final concentration 4 mM) during 3 h, under shaking at ambient temperature and centrifuged (14000 g, 20 min) to retrieve the supernatant containing the capsular EPS fraction. EPS fractions (i.e. colloidal and capsular fractions) were acidified to 0.5% (v/v) of nitric acid (14 M Suprapur, Merck), and stored at 4°C until analysis. Final pellet was dried and mineralized with nitric acid (14M) in a microwave oven (CEM, Mars-5) to extract the intracellular Cu fraction.

Total dissolved Cu samples were analyzed using inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES, Agilent 720-ES), and inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS Series II, Thermo Electron). Periphyton extracts were analyzed using ICP-MS. Limit of quantification (LQ) are 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ and 0.050 $\mu\text{g L}^{-1}$ for water, 3 $\mu\text{g g}^{-1}$ dry weight (dw) and 1.5 $\mu\text{g g}^{-1}$ dw, for ICP-AES and ICP-MS, respectively. Quality controls were routinely checked using a certified reference material (River water, TM 27.3 ; plankton, BCR-414) .

2.2.4. Periphyton characterization

Periphyton was carefully scraped from the slides with a razor blade and suspended in 1:1 (v/v) demineralized:mineral water (Volvic, France) before being homogenized and divided in different volumes, in order to measure the following parameters.

2.2.5. Total chlorophyll a, diatom diversity and photosynthetic efficiency measurement

Total chlorophyll *a* (chl *a*) was determined by multi-wavelength pulse-amplitude-modulated (PAM) fluorometry on a Phyto-PAM system (H. Walz GmbH, Germany) as described in Schmitt-Jansen and Altenburger (2008). Photosynthetic efficiency was estimated using the saturation pulse method on the Phyto-PAM fluorometer to determine the maximal PSII quantum yield (Y_{II} , Schreiber *et al.* 2002) as described in Lambert *et al.* (2015). It reflects the number of functional photosystems II (PSII), and therefore more generally the

physiological state of the phototrophic communities (Tlili *et al.* 2010). Diatom samples were prepared at week 4 and taxonomic identification was performed to EU standard NF EN 13946. About 400 frustules were counted per slide at 1000× magnification, and diatoms were identified to the lowest taxonomic level possible using standard references (Krammer and Lange-Bertalot 1986–1991) and recent nomenclature updates.

2.2.6. Periphyton tolerance assessment

The same medium should be used for all toxicity tests, in order to avoid changes in metal bioavailability during metal toxicity testing (Blanck, 2002; Blanck *et al.* 2003). Accordingly and to improve standardization, an equivalent mixture of demineralized water and mineral water (Volvic, France) was used to prepare periphyton suspensions and Cu solutions. A semi-logarithmic series of Cu concentrations was freshly prepared to obtain 7 different Cu concentrations, ranging from about 0.32 to 320 mg/L for phototrophic tolerance assessment and from about 0.032 to 32 mg L⁻¹ for heterotrophic tolerance assessment. Copper concentrations in each dilution were checked using inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS X Series II, Thermo Electron).

The tolerance of phototrophic periphyton communities to Cu was assessed at week 3 and week 4 using photosynthetic efficiency as endpoint, based on the measurement of maximal quantum yield (Y_{II}) of algae. To assess this parameter, periphyton suspensions (1.8 mL, see procedure below) were exposed to increasing concentrations of Cu (0.9 mL) in a climatic chamber (MLR-350 Versatile Environmental Test Chamber, Sanyo), at temperature of microcosms during growth (18 or 28°C) or intermediate temperature (23°C) under artificial light (1400 lux). Samples were then kept for 30 min in a dark chamber and PSII quantum yield (665 nm) was determined as mentioned above.

The tolerance of heterotrophic periphyton communities to Cu was assessed at week 4 using β -glucosidase (β -Glu), leucine amino peptidase (Lap) and phosphatase (Pase) activities as endpoint. These extracellular enzymatic activity were measured using fluorescent-linked substrates (4-methylumbelliféryl- β -D-glucopyranoside or MUF-GLU, L-leucine-7-amido-4-methylcoumarin hydrochloride or MCA-Lap and 4-methylumbelliféryl phosphatase or MUF-P; Sigma-Aldrich). First periphyton suspensions (1.7 mL) were exposed to increasing concentrations of Cu (0.3 mL) in the dark, at 23°C, under gentle shaking, for 1 h. Then, periphyton suspensions were incubated with 1 mL of MUF-GLU, MCA-Lap or MUF-P at saturating concentrations (750 μ M for MUF-Glu and MCA-Lap and 3000 μ M for MUF-P), in

the dark, at 23°C, under gentle shaking, for 1h40 (β-Glu), 1h (Lap) or 1h30 (Pase). 300 µL of glycine buffer (pH 10.4; glycine 0.05 M, NH₄OH 0.2 M) were then added to stop the enzymatic reaction. Fluorescence of MUF and MCA was measured without delay following centrifugation (10 min, 5000 g) using a Biotek synergyHT fluorometer at 360/460nm excitation/emission. For each sample replicate, 4 blanks and two analytical replicates were analyzed for each concentration.

Given the influence of periphyton biomass on PICT measurement, in terms of both chlorophyll *a* concentrations and dry weight (Lambert *et al.* 2015), we diluted the initial periphyton suspension with the demineralized:mineral water mixture (see above) to obtain, for each sample, periphyton suspension concentrations, about 2000 µg chl*a*/L (measured with the PhytoPAM fluorometer) concerning phototrophic tolerance assessment, and about 5000 µg chl *a* L⁻¹, concerning heterotrophic tolerance assessment. Phototrophic biomass (based on chl*a* concentrations) might give a relative estimation of the total biomass (Lambert *et al.* 2015).

2.2.7. Data processing

Variations in Cu bioaccumulation (colloidal, capsular and intracellular fractions) among thermal conditions were tested using one-way repeated measures ANOVA followed by a *post hoc* Tukey test. Variations in dissolved Cu among thermal and sampling dates and variations in water physico-chemical characteristics among thermal and treatment conditions were tested using two-way repeated measures ANOVA followed by a *post hoc* Tukey test in R version 2.15.0 (R Development Core Team 2012). Data were log-transformed before statistical analysis to satisfy the assumption of normality and homogeneity of variances.

The analysis of results from short-term bioassay was conducted using functions from the ‘drc’ package (Ritz and Streibig 2005) in R version 2.15.0 (R Development Core Team 2012). Dose-response curves were fitted to the data using the four-parameter log-logistic model given by the formula:

$$response = c + \frac{d - c}{1 + \exp\{b \times (\log(Dose) - \log(e))\}}$$

where *b* denotes the slope of the curve around *e*. Parameters *c* and *d* are the lower and upper limits of the curve, respectively, and *e* denotes the EC₅₀, the dose producing a response half-way between the upper and the lower limit.

2.3. Results

2.3.1. Physico-chemical data

Table VI.1. reports mean values of the main physical-chemical variables measured in the microcosms before and after each water renewal. In both control and Cu-exposed microcosms, silica concentrations increased slightly with temperatures ($p>0.05$), in contrast to dissolved oxygen concentrations which significantly decreased from 10.6 to 9.8 mg L⁻¹ between 18 and 28°C ($p<0.05$). Silica concentrations were higher in Cu microcosms, for each temperature tested, with a significant difference at 28°C ($p<0.05$). In contrast, DOC concentrations slightly decreased in Cu-exposed microcosms compared to Control ($p>0.05$).

2.3.2. Copper exposure

In Control microcosms (i.e. without Cu addition), dissolved Cu concentrations remained very low (<LQ) throughout the experiment. Mean dissolved Cu concentrations measured 2 hours after water renewal in all Cu-exposed microcosms were 10.2 ± 0.4 µg L⁻¹ at week 2, and 8.3 ± 0.2 µg L⁻¹, at week 3, without significant difference between temperatures, whatever the sampling time ($p>0.05$; Fig VI.1.). One week after water renewal, mean Cu concentrations in all Cu microcosms were not significantly different from Cu concentrations measured 2 h after the previous water renewal, whatever the temperature ($p>0.05$).

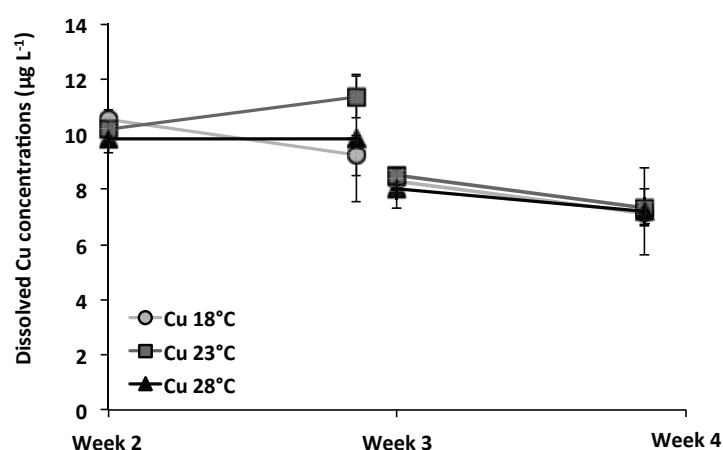


Figure VI.1. Mean (\pm sd ; n=3) dissolved Cu concentrations (µg L⁻¹) measured in each Cu-exposed microcosm between week 2 and week 4. Full lines indicate the time-course of concentrations between each water renewal.

2.3.3. Copper bioaccumulation

After 4 weeks of exposure, total Cu concentrations in periphyton growing in Cu-exposed microcosms were $211 \pm 11 \mu\text{g g}^{-1}$ DW at 18°C , $192 \pm 2 \mu\text{g g}^{-1}$ DW at 23°C and $168 \pm 25 \mu\text{g g}^{-1}$ DW at 28°C , with no significant difference between temperatures ($p > 0.05$), despite a slight decreasing tendency with increasing temperature (Fig VI.2.). Apparently, this decreasing tendency was mainly due to a decrease in externalized Cu concentrations, represented by colloidal and capsular fractions, although it was not significant ($p > 0.05$). In contrast, internalized Cu concentrations, represented by the intracellular fraction, were relatively stable, with mean values close to $80 \mu\text{g g}^{-1}$ DW, whatever the temperature.

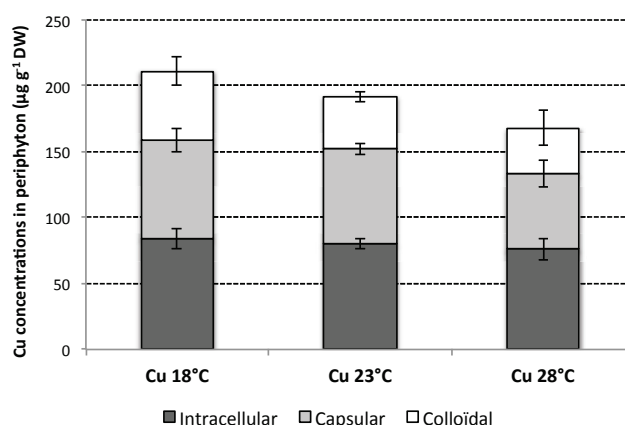


Figure VI.2. Mean (\pm sd ; $n=3$) intracellular, capsular and colloidal Cu concentrations in periphyton ($\mu\text{g g}^{-1}$ dry weight) at week 4, in the 3 Cu-exposed microcosms incubated at 18°C , 23°C and 28°C .

2.3.4. Periphyton characterization

2.3.4.1. Algal biomass and diatom assemblage structure

In Control microcosms, chl *a* concentrations gradually increased during 4 weeks, without significant difference between temperatures ($p > 0.05$; Fig VI.3A.). In Cu-exposed microcosms, chl *a* concentrations also gradually increased during 4 weeks. A temperature effect was detected at the last sampling time with a lower value at 23°C than those at 18°C and 28°C , with a significant difference between 18°C and 23°C ($p < 0.05$). During 4 weeks, no effect of Cu on chl *a* concentrations was detected, except at week 2 at 18°C , with chl *a* concentrations significantly lower in Cu-exposed microcosms ($p < 0.05$).

After 4 weeks, a total number of 65 diatom species representing 34 genera were identified. The initial diatom assemblage (i.e. inoculum), sampled in the Morcille River, was characterized by a higher specific richness (31 ± 3 ; data not shown) than those sampled in the

microcosms after a 4-week growing period (7 to 20 species according to temperature and Cu exposure; data not shown). The 17 dominant diatom species (occurring at more than 3% relative abundance in at least one sample) are listed in Table VI.2. The initial diatom assemblage was dominated by three main species (i.e. *Cocconeis pseudolineata*, *Cocconeis placentula*, *Rhoicosphenia abbreviata*) which represented each more than 10% of the total diatom assemblage. However after 4 weeks of periphyton development in control microcosms at 18°C, communities were dominated by *Fragilaria gracilis* (FGRA), and *Nitzschia palea* (NPAL), which respectively represented about 33% and 26% of the total relative diatom abundance. With increasing temperature, the proportion of NPAL and FGRA was modified, with FGRA becoming strongly dominant at 28°C ($97.0 \pm 2.5 \%$), in Control communities, and NPAL which accounted for less than 3% of total diatoms at this temperature. After 4 weeks, specific richness in control microcosms (data not shown) was similar between 18 and 23°C (20 ± 0), but strongly decreased at 28°C (7 ± 1). Under Cu exposure context, diatom assemblages were also dominated by NPAL and FGRA, which respectively represented about 76% and 6% of the total relative diatom abundance at 18°C. In Cu microcosms, the relative abundance of these two dominant diatom species, as well as the specific richness (14 ± 3), were relatively similar at the three temperatures tested.

	ADMI	AINA	APED	CCMS	COPL	CPLI	CYCL	EOMI	FGRA	GEXL	MPMI	NGRE	NLIN	NPAL	PLFR	PTLA	RABB
Inoculum	8.6 ±2.3	7.4 ±1.8	5.4 ±1.3	0.0 ±0.0	15.6 ±5.3	11.4 ±1.8	0.0 ±0.0	5.7 ±2.3	0.5 ±0.5	0.0 ±0.0	0.4 ±0.3	2.2 ±1.0	0.0 ±0.0	1.8 ±0.4	3.2 ±0.8	7.7 ±1.6	11.9 ±1.9
Control 18°C	17.7 ±5.3	0.0 ±0.0	0.2 ±0.3	1.8 ±0.5	0.1 ±0.1	0.8 ±1.0	4.2 ±2.1	1.2 ±0.6	32.7 ±15.1	3.4 ±4.0	5.5 ±3.8	0.0 ±0.0	0.5 ±0.2	26.4 ±12.5	0.2 ±0.1	1.1 ±0.4	0.0 ±0.0
Cu 18°C	3.2 ±1.0	0.1 ±0.2	0.1 ±0.2	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	1.0 ±0.8	0.2 ±0.1	2.4 ±0.7	5.7 ±3.3	0.0 ±0.0	0.9 ±1.3	0.0 ±0.0	1.8 ±1.3	75.6 ±10.1	0.3 ±0.3	5.1 ±3.5	0.0 ±0.0
Control 23°C	1.4 ±0.5	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	1.3 ±0.2	0.1 ±0.3	0.5 ±0.4	3.3 ±0.0	1.6 ±0.1	63.9 ±2.2	3.4 ±0.3	1.3 ±0.1	0.0 ±0.0	0.5 ±1.2	15.3 ±4.3	0.2 ±0.2	1.3 ±0.8	0.2 ±0.0
Cu 23°C	0.5 ±0.5	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	0.1 ±0.2	0.2 ±0.3	1.1 ±0.4	0.0 ±0.0	0.9 ±0.1	7.8 ±2.2	0.3 ±0.3	0.2 ±0.1	0.0 ±0.0	2.7 ±1.2	83.1 ±4.3	0.1 ±0.2	1.2 ±0.8	0.0 ±0.0
Control 28°C	0.5 ±0.3	0.1 ±0.2	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	0.1 ±0.1	0.3 ±0.4	0.1 ±0.2	97.0 ±2.5	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	0.2 ±0.2	0.0 ±0.0	0.8 ±1.4	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0
Cu 28°C	0.6 ±0.3	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	0.1 ±0.2	0.1 ±0.2	0.0 ±0.0	2.3 ±0.9	11.6 ±7.4	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	0.5 ±0.6	80.9 ±8.4	0.2 ±0.2	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0

Table V1.2. Mean relative abundances ($\pm sd$; $n=3$), at week 4, of the 17 dominant diatom species, for the inoculum and the 6 exposure contexts (thermal and exposure context) (i.e. representing more than 3% relative abundances in at least one sample). Species abbreviations: ADMI: *Achnanthydium minutissimum*, AINA: *Amphora inariensis*, APED: *Amphora pediculus*, CCMS: *Cyclotella comensis*, COPL: *Cocconeis pseudolineata*, CPLI: *Cocconeis placentula*, CYCL: *Cyclotella* sp, EOMI: *Eolima minima*, FGRA: *Fragilaria gracilis*, GEXL: *Gomphonema exilissimum*, MPMI: *Mayamaea perititis*, NGRE: *Navicula gregaria*, NLIN: *Nitzschia linearis*, NPAL: *N. palea*, PLFR: *Planorhithidium frequentissimum*, PTLA: *Planorhithidium lanceolatum*, RABB: *Rhoticosphenia abbreviata*.

2.1.1.1. Photosynthetic efficiency

In control and Cu microcosms, photosynthetic efficiency remained stable during 4 weeks (control: 0.58 ± 0.03 ; Cu: 0.63 ± 0.02), without significant difference between temperatures ($p > 0.05$; Fig VI.3B.). During 4 weeks, and for each temperature tested, photosynthetic efficiency was slightly higher in Cu-exposed communities, even if no significant difference was detected between control and Cu-microcosms ($p > 0.05$), except after 4 weeks at 18°C ($p < 0.05$).

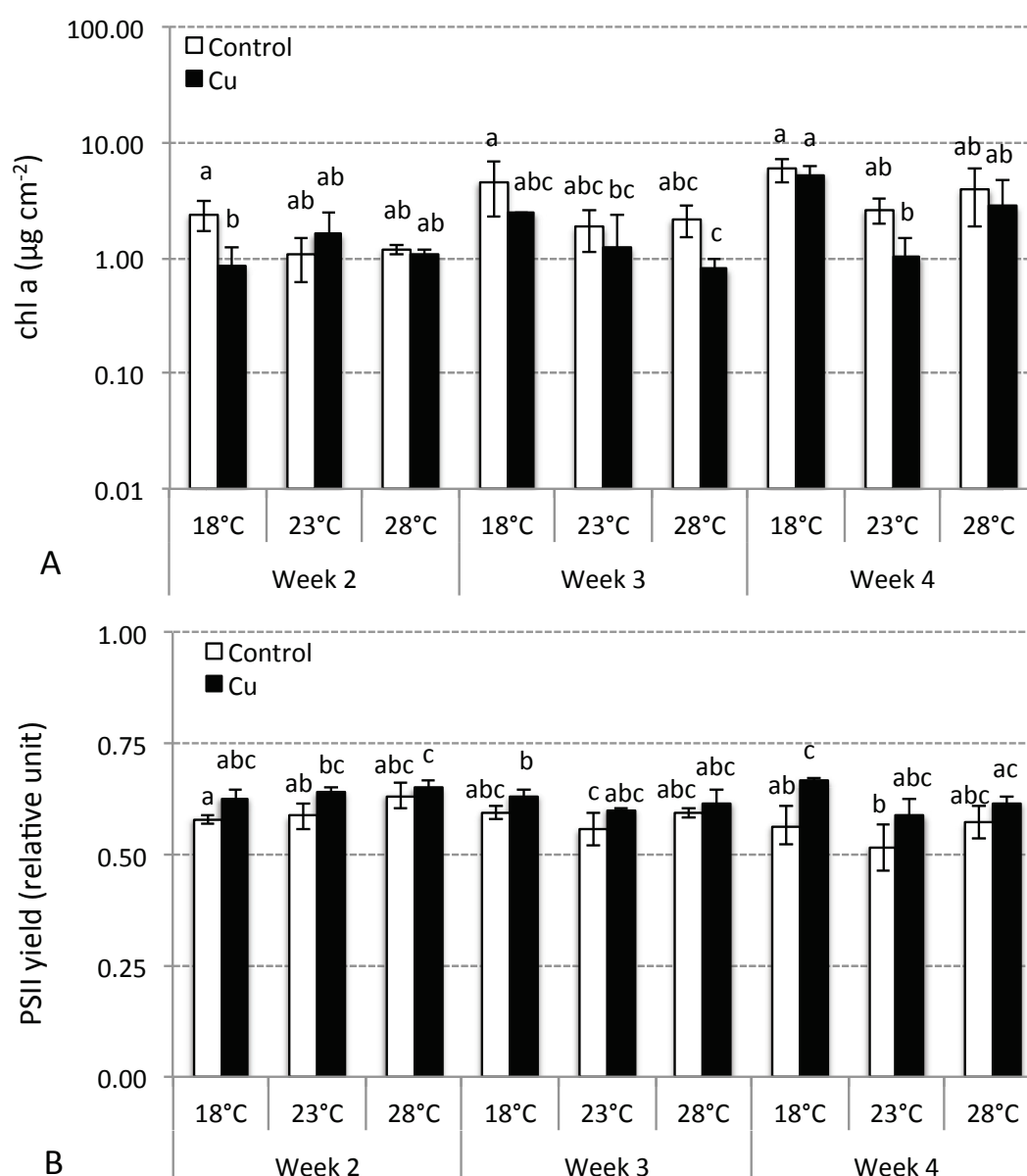
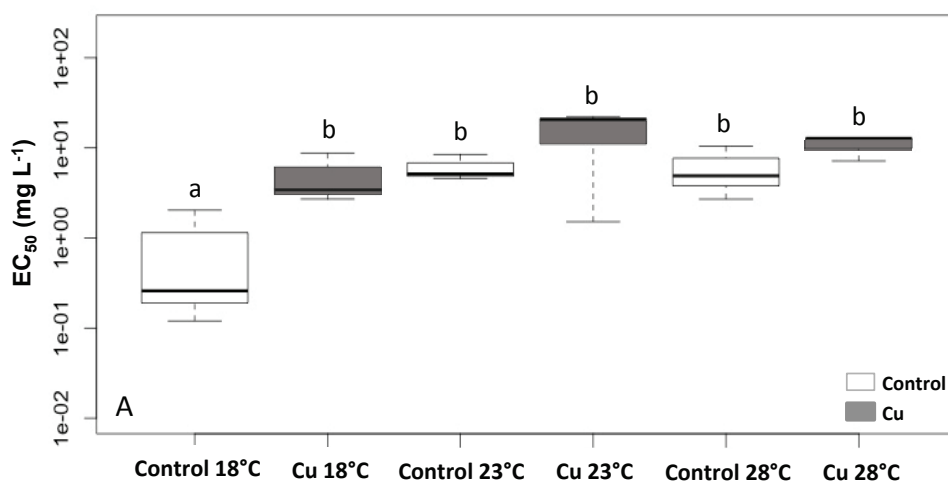


Figure VI.3. Time-course of concentrations of chlorophyll a (mean \pm s.d, $\mu\text{g cm}^{-2}$; $n=3$) (A) and PSII yield (mean \pm s.d, relative unit ; $n=3$) (B) between week 2 and week 4 in Control and Cu-exposed microcosms, incubated at 18°C , 23°C and 28°C . Different letters indicate significant differences between treatments (thermal and exposure context), at a given sampling time (ANOVA, $p < 0.05$).

2.3.5. Tolerance assessment

2.3.5.1. Phototrophic communities

The Cu-tolerance assessment for phototrophic communities, performed at week 3 and week 4, was based on photosynthetic efficiency (Fig VI.4.). Whatever the sampling time and the temperature, the tolerance levels (based on EC_{50} values) measured in Cu microcosms (mean values varying between 5.0 and 283.8 $mg\ L^{-1}$, according to sampling time and temperature) were higher than those measured in control communities (0.8 – 6.1 $mg\ L^{-1}$). However, significant differences ($p < 0.05$) were only detected at 18°C, at week 3 (Fig VI.4A.), and at 23°C, at week 4 (Fig VI.4B.), revealing a temperature effects on tolerance levels. Those differences were explained by a low EC_{50} value in control microcosms at 18°C, at week 3 ($0.8 \pm 1.1\ mg\ L^{-1}$; Fig VI.4A.); and a very high EC_{50} value in Cu microcosms at 23°C, at week 4 ($283.8 \pm 27.0\ mg\ L^{-1}$; Fig VI.4B.)



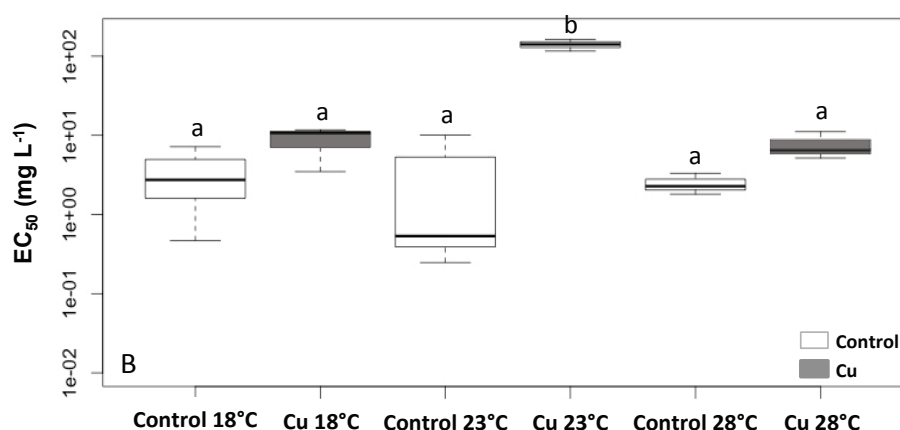


Figure VI.4. Boxplot of EC_{50} values (mg Cu L^{-1}) determined for phototrophic communities, based on photosynthetic yield, at 3-week (A) and 4-week (B), after a 2h30 acute exposure. The horizontal line represents the median. The upper and lower limits of the box represent the 75th and 25th percentiles. Different letters indicate significant differences between treatments (ANOVA, $p < 0.05$, $n = 3$)

2.1.1.2. Heterotrophic communities

The Cu tolerance assessment for heterotrophic communities, performed at week 4, was based on three extra-enzymatic activities (β -Glu, Lap, Pase). The short-term toxicity tests performed using Pase activity revealed no effect of the toxicant (in our experimental conditions) on this parameter (data not shown). Accordingly, no EC_{50} values were determined.

At 18°C, tolerance level (EC_{50}) obtained from β -Glu with Cu communities ($1.02 \pm 0.55 \text{ mg L}^{-1}$), was 20 fold higher than those of control communities ($0.05 \pm 0.03 \text{ mg L}^{-1}$) ($p < 0.05$; Fig VI.5A.). However, the tolerance level of control communities gradually increased with temperature, with a significant difference ($p < 0.05$) between 18°C and 28°C, where EC_{50} values reached $1.13 \pm 0.69 \text{ mg L}^{-1}$ (Fig VI.5A.). Conversely, no effect of temperature was detected on the tolerance levels of Cu-exposed communities ($p > 0.05$). Consequently, no significant difference ($p > 0.05$) was observed between tolerance levels of control and those of Cu-exposed communities at 23 and 28°C.

When considering Lap activity (Fig VI.5B.), no significant difference was observed at 18°C between Control ($1.75 \pm 0.19 \text{ mg L}^{-1}$) and Cu-exposed ($2.20 \pm 0.12 \text{ mg L}^{-1}$) communities. However, the tolerance level of Control communities significantly decreased with temperature, with mean values of $1.30 \pm 0.50 \text{ mg L}^{-1}$ and $0.64 \pm 0.18 \text{ mg L}^{-1}$, at 23 and 28°C respectively, with significant difference between 18 and 28°C ($p < 0.05$). In the same

way, tolerance levels of Cu-exposed communities decreased with temperature, with significant difference between 18 and 28°C ($p<0.05$). However, this decrease was less pronounced in Cu-exposed communities ($1.44 \pm 0.35 \text{ mg L}^{-1}$ at 28°C). Consequently, significant difference ($p<0.05$) was observed between tolerance levels of control and those of Cu-exposed communities at 23 and 28°C.

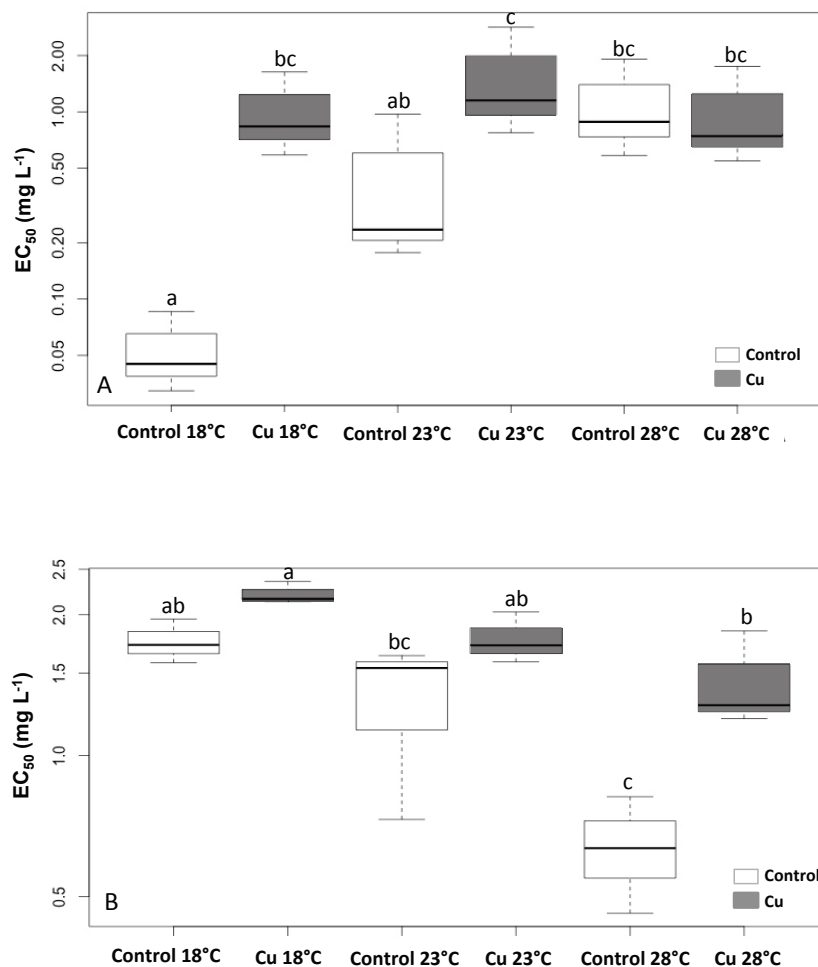


Figure VI.5. Boxplot of EC_{50} values (mg Cu L^{-1}) determined for heterotrophic communities at 4-week, based on β -glucosidase (A) and Lap activities (B), after a 2 h 40 acute exposure. The horizontal line represents the median. The upper and lower limits of the box represent the 75th and 25th percentiles. Different letters indicate significant differences between treatments (ANOVA, $p<0.05$, $n=3$)

2.4. Discussion

2.4.1. Influence of temperature on the sensitivity of Control communities

In accordance to our initial hypothesis, we observed that temperature had significant effects on the structure of diatom assemblages of Control communities. Indeed, taxonomic analysis revealed a shift in diatom assemblage composition with increasing temperature, as previously shown (Blanchard *et al.* 1996; Blinn *et al.* 1989), leading to a strong decrease in diversity after a 4-week growth at 28°C. This result was consistent with those of Larras *et al.* (2014), who observed also a decrease in diatom diversity in periphyton communities, between 18 and 28°C. In our study, increasing temperatures selected *Fragilaria gracilis* which accounted for more than 95% of total diatoms at 28°C at the end of the experiment (week 4), suggesting that this species was particularly adapted to the temperature increase. However, despite this marked shift in diatom assemblages, no significant effect of temperature was detected, neither in total algal biomass nor in photosynthetic efficiency. This was consistent with the findings of Pesce *et al.* (2009), who mentioned that the effects of environmental stressors on microbial diversity (i.e. algal and bacterial composition) are not always detectable with community-level endpoints such as algal biomass and bacterial activity. In the same way, tolerance levels based on phototrophic activity measurement of Control communities were relatively stable with temperature, except at week 3, when communities growing at 18°C were significantly more sensitive to Cu than communities growing at 23°C and 28°C, respectively. At week 4, no significant effect was observed between temperatures, revealing that the effect of temperature increase on the tolerance level of non-exposed phototrophic was only transient. Moreover, EC₅₀ values obtained in Control communities at week 3 (23°C and 28°C) and week 4 (18°C, 23°C and 28°C) were higher (i.e. $6.2 \pm 1.1 \text{ mg L}^{-1}$) than EC₅₀ values (i.e. 0.2 - 3.0 mg L⁻¹) measured previously using the same toxicity test protocol with Control communities originated from the same sampling site and growing for 3 weeks in the same experimental conditions (Lambert *et al.* in prep). The high tolerance level observed in the present study could be due to the high proportion of FGRA, which was previously reported to be tolerant to metals (Morin *et al.* 2012a). The 3-fold increase in FGRA proportion from 18°C to 28°C in Control communities (as well as the 2-fold increase observed in Cu-exposed communities) showed that this species is also tolerant to high temperature. The occurrence of co-tolerance between temperature and Cu due to the possible selection of diatom species both tolerant to increasing temperatures and to Cu exposure was also suggested by Lambert *et al.* (submitted). Such a hypothesis was also proposed by Boivin *et al.* (2005) to explain the Cu-

tolerance increase they observed in periphytic bacterial communities growing at 20°C compared to communities growing at 10°C. In the present study, the influence of temperature on the sensitivity of heterotrophic communities to Cu was not determinable from the measure of Pse activity, since no acute effect of Cu was detected on this parameter, whatever the temperature tested. Conversely, acute exposure to Cu strongly inhibited β -Glu and Lap activities. The analysis of the dose-response curves obtained with those enzymatic activities showed a strong influence of temperature on the sensitivity of Control heterotrophic communities towards Cu. However, the direction of the temperature influence on the measured sensitivity levels was variable according to the kind of the enzymatic activity. Indeed, when considering β -Glu activity, we observed an increase in tolerance levels of Control communities with increasing temperatures. Thus, based on this enzymatic activity, Control communities growing at 23 and 28°C appeared to be respectively about 8- and 18-fold more tolerant than those growing at 18°C. In contrast, tolerance level of Control communities, based on Lap activity, strongly decreased with increasing temperatures, with tolerance level at 28°C, almost 3-fold lower than those at 18°C. These results supported the fact that it is primordial to consider different functional compartments (i.e. phototrophic and heterotrophic communities), and also using different functional descriptors to better assess periphyton response to stressors.

2.4.2. Influence of temperature on copper-induced community tolerance during copper chronic exposure

2.4.2.1. Copper effects at initial temperature (i.e. 18°C)

Without temperature stress (i.e. at 18°C), the chronic Cu exposure delayed the algal growth. Indeed, chl *a* concentrations were significantly lower in Cu-exposed communities than in Control ones at week 2, as previously shown by Guasch *et al.* (2002), on periphyton growing at 16°C, under Cu exposure (10-17 $\mu\text{g L}^{-1}$). Cu exposure had also significant effects on the algal structure, with a shift in diatom assemblage composition, leading to a strong decrease in diversity, as previously shown (Serra *et al.* 2009; Morin *et al.* 2012b). Thus, at week 4, Cu exposure mainly selected for NPAL, which was about 3-fold more represented in Cu-exposed communities (i.e. 76 %) than those of Control communities at 18°C. Roussel *et al.* (2007) and Tien (2004) already highlighted that NPAL tends to be abundant in biofilms growing in metal polluted waters. Consequently, these structural changes in diatom assemblages led to a Cu-induced community tolerance, at 18°C, with EC₅₀ values, determined

from the bioassays performed at week 3 on the photosynthetic efficiency, significantly higher in Cu-exposed communities than in control one. This finding was consistent with our previous results which showed that phototrophic periphyton communities growing at 18°C under chronic exposure to Cu (60 $\mu\text{g L}^{-1}$) were about 18-fold more tolerant to Cu than Control communities (Lambert *et al.* in prep). However, EC₅₀ values obtained in this previous study with communities exposed to Cu at 18°C (about 45 mg L^{-1}) were much higher than those observed in the present study (about 5 mg L^{-1}). Here the significance of the difference in tolerance levels, at 18°C, was only transient and no difference was observed between Control and Cu-exposed communities at week 4, even if tolerance levels of Cu-exposed communities were stable between week 3 and week 4 and still slightly higher than those of Control communities. This lack of significant difference could be explained in the one hand by the relatively high tolerance level observed in Control communities, and in the other hand by the moderated tolerance level of Cu-exposed communities, as mentioned above. Such a limited increase in Cu tolerance suggests a limited exposure of periphytic phototrophic microorganisms to Cu. This hypothesis is supported by the observation of a slight stimulation of the photosynthetic efficiency of Cu-exposed communities, at 18°C, all over the study (with a significant difference compared to the controls at week 4), which reflects a hormesis effect (i.e. favorable biological response to low exposure to stressor), while it has been previously shown that Cu exposure can significantly reduce biofilm photosynthesis efficiency (Serra and Guasch, 2009; Lambert *et al.* 2012).

Indeed, periphyton communities were characterized by low Cu bioaccumulation, with total Cu concentrations reaching only between 168 and 211 $\mu\text{g Cu g}^{-1}$ DW, in contrast to previous study showing mean total Cu concentrations of 1580 $\mu\text{g Cu g}^{-1}$ DW, at the same temperatures (i.e. 18 and 23°C) (Lambert *et al.* submitted). Thus, Cu concentrations measured in the present study in the intracellular and capsular fractions were almost 4-fold lower than those in the corresponding fraction (i.e. so-called “internalized”) measured, at 18 and 23°C, in Lambert *et al.* submitted. The low Cu uptake by periphyton was in line with stable dissolved Cu concentrations measured in microcosms after each water renewal contrary to previous microcosm studies showing a decrease in dissolved Cu concentrations because of high Cu uptake rates by biofilms (Boivin *et al.* 2007; Knauer *et al.* 1997; Lambert *et al.* 2012).

This low Cu bioaccumulation could be explained by (i) high pH values (ranged between 8.3 and 9.7), measured during the experiment, leading to a decrease in Cu bioavailability and/or by (ii) a strong biodilution of Cu in the periphyton biomass. This last hypothesis was therefore supported by the fact that a 1000-fold higher biomass periphyton

was measured in this present study at 18°C, than those measured, at the same temperature, in the study of Lambert *et al.* (submitted). Furthermore, this strong periphyton biomass, could have accelerated Cu adsorption, and prevent Cu internalization, due to an increase in the number of fixation sites in the EPS matrix). Decreasing dissolved Cu concentrations probably occurred before water sampling, which was performed 2 h after the addition of dissolved Cu and thus could explain no decreasing in dissolved Cu concentrations observed between water renewals. Levy *et al.* (2007) reported that 1 h of Cu exposure was sufficient to ensure equilibrium between Cu in solution and Cu in marine algal cells. Similarly, we could suggest that high pH values could have prevented Cu adsorption/internalization, by favoring precipitated forms of Cu.

Despite limited Cu exposure of periphyton, we observed heterotrophic community adaptation to this metal, at 18°C, when bioassays were based on β -Glu activity measurement. However, this adaptation was not observed, at 18°C, when bioassays were based on Lap activity measurement

2.4.2.2. Influence of temperature increase on copper effects

As observed with Control communities, temperature had no effect on photosynthetic efficiency of Cu-exposed communities. Furthermore, temperature combined to Cu had no effect on the structure of diatom assemblages, in contrast to Control communities, suggesting that Cu exposure was the main factor controlling the evolution of Control diatom assemblages. Thus, NPAL remained dominant whatever the temperature tested, suggesting that this species, which was favored by Cu exposure, was also particularly adapted to the temperature increase. In accordance with the stability observed in the structure of diatom assemblages, the tolerance levels of phototrophic Cu-exposed communities measured at week 3 and week 4 were relatively stable whatever the temperature, except at 23°C, at week 4, when a strong increase in the CE_{50} values was observed. At 23°C, we simultaneously observed a strong algal growth inhibition in Cu-exposed communities, which could reflect a cost of adaptation, as previously suggested by Navarro *et al.* (2008). However, both the tolerance increase and the algal growth inhibition observed at 23°C, was not explainable by a different Cu exposure level at this temperature. Indeed similar Cu concentrations in periphyton were measured after the 4-week exposure at the three temperatures tested, whatever the considered fraction (colloidal, capsular or intracellular fraction). As for Control communities, the influence of temperature on Cu sensitivity of heterotrophic communities varied with functional descriptors used for bioassays. Indeed, bioassays performed at week 4

and based on β -Glu activity measurement, showed no influence of temperature increase on tolerance levels of Cu-exposed communities, in contrast to bioassays based on Lap activity measurement. However this reduction in tolerance levels with temperature was relatively slight in comparison with those of Control communities, with a 1.5-fold lower tolerance level at 23°C than those at 18°C. Accordingly, reduction tendencies in tolerance levels of both control and Cu-exposed communities led to a significant difference between these two communities at 28°C. As structure of diatom assemblages, Cu exposure was the principal factors affecting heterotrophic community sensitivity to this metal. These results were inconsistent with those of Boivin *et al.* (2005), who showed a 6-fold more tolerant bacterial communities to Cu at 20°C than at 10°C. However tolerance acquisition assessment was based on bacterial capacity to use different sources of carbon and it clearly appears from our present results that the influence of temperature on the PICT response of heterotrophic communities can greatly vary according to the measured functional parameter.

2.5. Conclusion

Chronic Cu-exposure induced significant changes in the diatom composition without major difference between temperatures. Conversely, the temperature increase affected diatom assemblage structure of non-Cu-exposed phototrophic communities. Nevertheless, and contrary to our initial hypothesis, temperature had very limited and transitory effects on the Cu-tolerance level of both exposed and non-exposed phototrophic communities. In the same way, temperature had no effect, or only a slight but significant negative effect, on Cu-tolerance levels of Cu-exposed heterotrophic communities determined from bioassays targeting β -glucosidase (β -Glu) and leucine amino peptidase (Lap) activities, respectively. In contrast, tolerance levels determined from the same extracellular enzymatic activities revealed a strong influence of temperature on the sensitivity of non-Cu-exposed heterotrophic communities towards Cu. However, the direction of the temperature influence on the measured sensitivity levels was variable according to the kind of the enzymatic activity and CE_{50} values obtained from β -Glu and Lap bioassays were respectively significantly enhanced or reduced with increasing temperatures. Such results suggest that changes in temperature can modify the capacity of non-Cu-exposed communities to tolerate subsequent Cu exposure.

However, the magnitude and the direction of the influence of temperature on Cu sensitivity greatly varied according to the microbial compartment studied (i.e. phototrophic or heterotrophic) and the measured functional descriptor.

3. Conclusions

Les résultats obtenus dans cette étude n'ont mis en évidence qu'un effet très modéré et transitoire de l'exposition chronique au Cu sur la croissance et l'activité des communautés phototrophes à 18°C. À l'inverse, à cette température, la composition des assemblages de diatomées a été significativement modifiée par l'exposition chronique au Cu, qui a largement favorisé le recrutement de l'espèce *Nitzschia palea*. 3 fois plus représentée dans les assemblages diatomiques exposés chroniquement au Cu que dans ceux non exposés. Cependant, ce changement de la structure diatomique en présence de Cu n'a induit qu'une faible acquisition de la tolérance des communautés à ce toxique, celle-ci n'ayant été détectée qu'au cours de la troisième semaine d'exposition.

L'absence d'effets majeurs du cuivre sur la croissance et l'activité photosynthétique des communautés phototrophes, associée à une limitation des processus adaptatifs conduisant à l'acquisition de tolérance, suggère un faible niveau d'exposition de ces communautés au Cu. Cette supposition a été appuyée (i) par de faibles niveaux de bioaccumulation du Cu mesurés, les concentrations totales en Cu mesurées dans le biofilm étant 9 fois moins élevées que celles mesurées dans les biofilms prélevés en hiver, soumis aux mêmes conditions thermiques (i.e. 18 et 23°C) et (ii) par un pH élevé du milieu, réduisant la biodisponibilité du Cu. Cette dernière hypothèse a été renforcée par les faibles concentrations en Cu labile mesurées tout au long des 4 semaines d'expérimentation (i.e. entre 1,3 et 2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$, quel que soit le contexte thermique), non présentées dans l'article 4 (voir protocole de la mesure des concentrations en Cu labile en annexe 1).

Dans ce contexte, l'augmentation de la température de +5 à +10°C n'a eu qu'une influence modérée sur les effets du Cu observés au niveau des communautés phototrophes, en n'engendrant que de faibles modifications de la composition diatomique et des variations transitoires des niveaux de tolérance mesurés. Ainsi, seule une acquisition significative de la tolérance au Cu a été observée, à 23°C, après 4 semaines d'exposition à ce métal. Cette influence modérée de la température sur les effets observés sur le compartiment phototrophe peut s'expliquer, au moins pour partie, par l'absence d'effets significatifs de ce paramètre sur les niveaux d'exposition des communautés de biofilm au Cu. En effet, aux trois températures testées, nous avons mesuré des niveaux similaires de bioaccumulation de ce métal, quel que soit la fraction du biofilm considérée (i.e. fraction intracellulaire et fractions de la matrice EPS).

En absence d'exposition chronique au Cu, l'augmentation de la température a également eu des effets limités sur la biomasse algale et l'efficacité photosynthétique. À l'inverse, dans ce contexte, la hausse de la température a influencé de manière significative la composition des assemblages de diatomées. Cependant, les changements de structures des assemblages diatomiques observés avec l'augmentation de la température n'ont induit qu'une modification transitoire de la sensibilité des communautés phototrophes à une exposition aiguë au Cu, avec un niveau de sensibilité mesuré plus élevé à 18°C mais uniquement au cours de la 3ème semaine.

Contrairement aux communautés phototrophes, et malgré le faible niveau d'exposition des communautés microbiennes périphytiques au Cu, nous avons observé à 18°C une acquisition de tolérance par les communautés hétérotrophes suite à leur exposition chronique à ce métal, principalement visible à partir des tests de toxicité réalisés en ciblant l'activité β -Glu. Sur la base de cette activité, la température n'a pas eu d'influence sur cette acquisition de tolérance. À l'inverse, les tests de toxicité réalisés sur l'activité Lap ont montré que la hausse thermique a significativement diminué les niveaux de tolérance des communautés exposées chroniquement au Cu. La différence des réponses des communautés hétérotrophes à la hausse thermique en terme de sensibilité en fonction de l'activité mesurée a été encore plus marquée pour les biofilms non exposés au Cu. Ainsi, les tests de toxicité réalisés sur l'activité β -Glu ont montré que l'augmentation de la température a engendré une diminution très marquée de la sensibilité de ces communautés, qui ont atteint, à 28°C, un niveau de tolérance au Cu similaire à celui des communautés exposées chroniquement à ce métal. À l'inverse, la hausse thermique a entraîné une augmentation très marquée des niveaux de sensibilité mesurés à partir de l'activité Lap.

L'ensemble des résultats obtenus dans cette étude montre donc que l'influence de la température sur les niveaux de sensibilité des communautés microbiennes périphytiques au Cu s'est principalement exercée au sein des biofilms non exposés à ce métal. Cela suggère donc une modification de la capacité de ces communautés à tolérer une exposition subséquente au Cu, modifiant ainsi leur seuil de vulnérabilité. Cependant, le sens et la magnitude de cette influence de la température sur les niveaux de sensibilité au Cu varient fortement selon le compartiment microbien étudié (i.e. phototrophe et hétérotrophe), mais aussi selon le descripteur fonctionnel considéré (i.e. activité enzymatique mesurée). Ceci suggère donc un risque de perturbation des processus microbiens si certaines fonctions s'avèrent plus vulnérables que d'autres, ce qui engendre, à terme, un risque de dysfonctionnement de l'écosystème.

Un des objectifs supplémentaires de cette étude était d'aborder la notion de saisonnalité dans la réponse des communautés phototrophes de biofilm à l'exposition chronique au Cu et dans l'influence de la température sur cette réponse.

En l'absence de stress thermique, une exposition chronique au Cu a induit des effets sur la structure (diversité diatomique, biomasse algale) et la fonction (activité photosynthétique) des communautés phototrophes de biofilms prélevés en hiver (température initiale de 8°C). Au contraire, la biomasse algale et l'activité photosynthétique des biofilms prélevés en fin d'été (température initiale de 18°C) n'ont pas été affectées significativement par l'exposition chronique au Cu. Seule la composition des assemblages diatomiques a été modulée par ce métal.

Une augmentation de la température de +5 à +15°C sur les communautés de biofilm prélevé en hiver a réduit significativement les effets du Cu sur la biomasse algale et l'activité photosynthétique. Cette réduction des effets du Cu sur la structure et la fonction du biofilm prélevé en hiver, avec l'augmentation de la température, a pu être attribuée pour partie à une diminution possible de la sensibilité des communautés phototrophes, au regard de la sélection d'espèces potentiellement tolérantes au Cu lorsque la température augmentait (hypothèse d'une co-tolérance au Cu et à la température). À l'inverse, une augmentation de la température de +5°C à +10°C sur les effets du Cu sur la biomasse algale et l'activité photosynthétique des communautés de biofilms prélevés en fin d'été n'a pas été observée. L'évolution des assemblages de diatomées a été influencée par l'augmentation de la température, mais uniquement en l'absence d'exposition au Cu. Malgré l'absence de changement dans la composition des assemblages diatomiques, exposés chroniquement au Cu, l'augmentation de la température a induit une augmentation de la tolérance des communautés phototrophes à ce métal, mais seulement après 4 semaines d'exposition chronique au Cu, et uniquement pour une hausse thermique de +5°C. En effet, aucune modification de la tolérance des communautés phototrophes au Cu n'a été observée après 3 semaines d'exposition chronique, quelle que soit la température testée.

Cette variabilité de l'influence de la température sur la réponse à l'exposition chronique au Cu des communautés phototrophes suggère ainsi un rôle la spécificité de la communauté microbienne initiale prélevée dans la réponse observée.

4. Résultats exploratoires complémentaires

Le concept « PICT » est basé sur le fait que l'exposition d'une communauté à un contaminant entraîne une sélection d'espèces tolérantes (sélection inter-spécifique) et/ou à une adaptation spécifique de certains microorganismes (i.e. sélection intra-spécifique). Ainsi, pour mieux appréhender les mécanismes mis en jeu dans la réponse adaptative des communautés phototrophes à l'exposition chronique au Cu, il nous a paru intéressant, en plus de l'analyse de la composition des assemblages diatomiques, d'évaluer, en fonction du contexte thermique, les stratégies et mécanismes de défense mis en place par le biofilm contre la toxicité métallique.

Pour ce faire, nous avons choisi d'évaluer, après 3 semaines d'exposition chronique au Cu, l'expression de gènes liés au métabolisme cellulaire chez les diatomées, qui est induite ou réprimée pour compenser l'impact des différents stress environnementaux (expression génétique non spécifique à une exposition métallique). Ainsi, nous avons ciblé des gènes impliqués dans le métabolisme photosynthétique (*psaA* et *d1*) et mitochondrial (*cox1*, *nad5* et *12s*) (voir détails annexe 2). D'autre part, nous avons également évalué l'expression de gènes impliqués dans la mise en place de mécanisme d'efflux bactérien, après 4 semaines de développement du biofilm. Pour ce faire, nous avons ciblé le gène *copA*, impliqué dans la mise en place de pompes à efflux ATPase de type P et dont l'expression est induite spécifiquement dans le cadre d'une exposition au Cu (voir Chapitre I § 2.3.3.). Ce travail a été réalisé en collaboration avec Patrice Gonzales, chercheur au CNRS de Bordeaux (EPOC). Les protocoles utilisés sont décrits en annexe 2.

Le tableau VI.2. montre les facteurs d'induction ou de répression de l'expression des différents gènes ciblés pour les diatomées, après 3 semaines d'exposition au Cu.

La répression de l'expression du gène *cox*, marquée par un facteur de répression important (i.e. 0,3), souligne une forte atteinte des complexes IV de la chaîne respiratoire mitochondriale, liée à un stress oxydatif, suggérant donc un effet du Cu, à 18°C, sur le métabolisme cellulaire des diatomées. L'expression du gène *d1* a été induite afin de compenser une perturbation du photosystème II, celle-ci étant légère au vu de la faible valeur du facteur d'induction (i.e. 2,1). L'induction significative de l'expression du gène *12S* souligne une augmentation du nombre de mitochondries, alors que l'expression du gène *nd5* correspond à la production de protéines impliquées dans la chaîne respiratoire mitochondriale.

La mise en place de mécanismes de défense contre le stress oxydatif a été soulignée par l'induction de l'expression du gène *sodMn*.

Les résultats obtenus ont également mis en évidence une influence de la température sur la réponse métabolique des diatomées à l'exposition au Cu. Ainsi, des effets plus forts du Cu sur le métabolisme photosynthétique des diatomées ont été observés à 23°C puisque les fortes valeurs du facteur d'induction respectivement obtenues pour l'expression du gène *psaA* (i.e. 6,5), et l'expression du gène *d1* (21,3) ont mis en évidence un impact sur les deux photosystèmes (PS I et PSII). Les résultats observés à 23°C suggèrent que la stratégie de défense qui repose sur l'augmentation de l'expression des gènes impliqués dans la production de protéines de la chaîne respiratoire mitochondriale (Nd5 et Cox) a été favorisée, au dépend de la stratégie de défense qui repose sur l'augmentation du nombre de mitochondries (ARN ribosomale 12S).

À 28°C, les effets du Cu sur le métabolisme cellulaire des diatomées ont semblé plus limités et se sont avérés assez comparables à ceux observés à 18°C, avec une perturbation légère du PSII, d'après la faible valeur obtenue du facteur d'induction de l'expression du gène *d1* (2,4). Cependant, la stratégie de défense adoptée a semblé rejoindre celle observée à 23°C puisqu'elle s'est également reposée sur une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la production de protéines de la chaîne respiratoire mitochondriale (nd5 et cox).

	18°C	23°C	28°C
<i>psaA</i>	1.5	6.5	0.3
<i>d1</i>	2.1	21.3	2.4
<i>nd5</i>	5.2	4.3	5.4
<i>cox</i>	0.3	3.0	2.7
<i>12S</i>	4.1	1.0	0.2
<i>sodMn</i>	4.1	1.8	0.7

Tableau VI.3. Facteurs d'induction et de répression de l'expression des différents gènes, impliqués dans le métabolisme photosynthétique (*psaA* ; *d1*) et mitochondrial (*nd5* ; *cox* ; *12S* ; *sodMn*) des diatomées, pour les trois contextes thermiques testés, après trois semaines d'exposition au Cu. Les résultats sont exprimés en facteurs d'induction ou de répression, par rapport à la condition contrôle (pas d'exposition au Cu). On considère une induction significative lorsque le facteur est supérieur ou égale à 2 (en jaune) et une répression significative lorsque le facteur est inférieur ou égal à 0,5 (en bleu).

Nous avons ainsi mis en évidence la mise en place de stratégies différentes de défense contre la toxicité du Cu, selon le contexte thermique. En effet, plus la température a été augmentée, plus la production de protéines de la chaîne respiratoire mitochondriale (Nd5 et Cox) a été induite et moins l'augmentation du nombre de mitochondries (ARN ribosomale

12S) a été utilisée comme stratégie de compensation des effets du Cu sur le métabolisme mitochondrial.

De plus, un impact plus important du Cu sur le métabolisme cellulaire des diatomées a été observé à 23°C, puisqu'une induction plus importante de l'expression du gène (*dl*), impliqué dans la production de protéine du PSII, a été nécessaire pour maintenir une activité photosynthétique suffisante. Ces résultats sont en accord avec une acquisition importante de la tolérance des communautés phototrophes au Cu, observée à 23°C, après 4 semaines d'exposition à ce métal. En effet, il est probable qu'une acquisition de la tolérance au Cu à 23°C ait pu permettre le maintien de l'activité photosynthétique de la communauté phototrophe, ce constat étant appuyé par (i) l'augmentation de la production de protéines impliquées dans les photosystèmes ainsi que par (ii) la stabilité de l'efficacité photosynthétique observée au cours des 4 semaines d'expérimentation.

Concernant le compartiment bactérien, aucune expression du gène impliqué dans la mise en place du mécanisme d'efflux reposant sur la production de pompe ATPase de type P (i.e. gène *copA*) n'a été observée, quel que soit le contexte d'exposition chimique et thermique.

Deux hypothèses sont proposées pour expliquer, *a minima*, l'absence d'expression du gène *CopA* :

- Étant donné l'absence d'expression basale du gène ciblé, il se peut que des erreurs de manipulation soient à l'origine de ces résultats.
- Si on admet un niveau basal d'expression, on peut supposer que les mécanismes d'efflux qui se mettent en place à la suite d'une exposition chronique au Cu constituent des mécanismes transitoires et n'interviennent que dans les premiers temps de l'exposition chronique au Cu, et sont rapidement remplacés par des mécanismes de séquestration intracellulaire, telle que la production de protéines chélatrices de métaux (i.e. méthallothionéine), qui perdure au cours de l'exposition chronique.

Cependant, ces résultats restent exploratoires et il s'avère nécessaire de poursuivre l'étude de la réponse génétique des communautés phototrophes et hétérotrophes à l'exposition au Cu, afin de conclure clairement sur une possible influence de la température sur la mise en place des stratégies et des mécanismes de défense au Cu, visés dans cette étude.

Chapitre VII

Discussion générale et Perspectives

1. Discussion générale

1.1. Apports des développements méthodologiques

Le premier objectif de la thèse était d'appréhender l'influence d'une hausse thermique sur la réponse de biofilms naturels à une exposition chronique au Cu, en évaluant, dans un premier temps, la réponse structurale et fonctionnelle des communautés microbiennes phototrophes. Les premiers résultats obtenus nous ont amené à proposer deux hypothèses qui concernaient l'influence de la température (i) sur les niveaux de sensibilité des communautés phototrophes au Cu (Hypothèse 1) et (ii) sur l'exposition des communautés de biofilm au Cu (Hypothèse 2) (Fig VII.1 et VII.2). Ces hypothèses ont servi de fil conducteur pour l'ensemble de la thèse.

Dans le cadre de la première hypothèse, des développements méthodologiques nous ont permis de mettre en œuvre des approches de type « PICT » en dissociant les effets possibles de différents paramètres expérimentaux durant les deux phases de cette approche (i.e. acquisition et mesure de la tolérance) de ceux réellement induits par l'exposition au Cu sur la tolérance du biofilm à ce métal. En effet, dans un contexte multistress, il est souvent délicat de réellement distinguer les effets des toxiques parmi les changements biologiques observés au sein des communautés exposées. Or, un des défis actuels en écotoxicologie est de mieux évaluer les liens entre exposition aux toxiques et effets biologiques, afin d'appréhender l'impact des contaminants sur la qualité écologique des milieux récepteurs. Si les approches « PICT » s'avèrent être particulièrement prometteuses pour contribuer à ce défi, elles gagneraient à s'appuyer sur des procédures plus standardisées, notamment au niveau des protocoles utilisés lors des tests de toxicité, comme cela a été récemment souligné par un collectif de chercheurs européens (Tlili *et al.* 2015). Dans ce sens, et au regard de nos résultats qui ont mis en évidence l'importance de la biomasse du biofilm sur les niveaux de tolérance mesurés, il apparaît nécessaire de mieux standardiser la concentration en suspension de biofilm utilisée dans les tests de toxicité aiguë (Chapitre IV).

Dans le cadre de la seconde hypothèse, les développements méthodologiques réalisés ont permis d'évaluer plus finement l'exposition des communautés de biofilm au Cu, en ciblant plus spécifiquement la bioaccumulation dans la fraction intracellulaire (et non la fraction « internalisée » qui incluait, avec notre protocole initial, la fraction intracellulaire mais également la fraction capsulaire de la matrice EPS) (Chapitre V). Ce type de développement s'inscrit dans une volonté croissante en écotoxicologie de mieux évaluer la fraction

responsable de la toxicité cellulaire, et non plus seulement de mesurer les concentrations totales métalliques dans le biofilm.

1.2. La température, un paramètre environnemental qui influence les effets du cuivre sur les communautés phototrophes de biofilm

Nous avons mis en évidence, au cours de cette thèse, une variabilité de l'influence de la température sur les effets du Cu sur le biofilm.

En effet, dans le cadre de biofilms prélevés en hiver (i.e. février), nous avons observé une influence significative d'une hausse thermique sur la réponse des communautés phototrophes périphytiques au Cu, lorsque le biofilm a été soumis à un scénario de contamination réaliste (i.e. $15 \mu\text{g L}^{-1}$) pendant plusieurs semaines (Chapitre III). Ainsi, une augmentation de la température de $+5^{\circ}\text{C}$, $+10^{\circ}\text{C}$ et $+15^{\circ}\text{C}$ (température initiale de 8°C) a entraîné la réduction, voire la suppression, des effets du Cu observés en l'absence de stress thermique (i.e. température du milieu) sur la structure (biomasse algale et répartition des classes algales) et le fonctionnement (activité photosynthétique) des communautés phototrophes (Fig VII.1.).

Cependant, lorsque les biofilms ont été prélevés en fin d'été (mi-septembre), un même niveau de contamination chronique au Cu n'a eu qu'un effet limité sur les communautés phototrophes (principalement au niveau de la composition diatomique) à la température du milieu (18°C). Dans ce contexte, la hausse de la température de $+5^{\circ}\text{C}$ et $+10^{\circ}\text{C}$ n'a exercé qu'une influence mineure sur ces effets structuraux (Chapitre VI) (Fig VII.2.).

La variabilité des effets du Cu sur le biofilm découle vraisemblablement principalement des caractéristiques intrinsèques du biofilm, telles que sa composition (i.e. diversité, classes algales), qui conditionne la sensibilité des communautés à ce toxique, et sa structure physique (i.e. matrice EPS), qui conditionne les niveaux d'exposition des communautés (en fonction du niveau de contamination du milieu). Ainsi, dans un contexte de hausse thermique, les effets du Cu sur le biofilm dépendent également de l'influence de la température sur les caractéristiques intrinsèques du biofilm, et donc des effets de ce facteur environnemental sur les communautés microbiennes.

En complément, le biofilm exerce également un effet indirect sur la biodisponibilité du Cu (et donc sur les niveaux d'exposition des communautés à ce métal), puisque l'activité microbienne modifie les propriétés physico-chimiques du milieu (i.e. variation du pH, liée à l'activité photosynthétique), et par conséquent, la spéciation du métal.

1.2.1. La température peut influencer l'adaptation des communautés microbiennes périphytiques au cuivre

Un stress thermique peut engendrer des effets sur les biofilms, notamment au niveau de leur composition microbienne, ce qui peut modifier les capacités d'adaptation des communautés à une exposition chronique au Cu.

Ainsi, nous avons montré qu'une augmentation de la température de +5°C à +15°C a engendré des modifications des assemblages diatomiques des biofilms prélevés en hiver et soumis à une exposition chronique au Cu (Chapitre III). Ces modifications ont conduit à la sélection marquée d'une espèce diatomique spécifique (i.e. *Achnanthes exiguum*), connue dans la littérature pour être tolérante au Cu (Soldo and Behra, 2000). Cette sélection, associée à une diminution des effets du Cu sur l'activité photosynthétique des biofilms soumis aux températures élevées, a permis de conclure à une possible augmentation de la tolérance des communautés phototrophes à ce métal, dans ce contexte de hausse thermique. À l'inverse, la composition des assemblages diatomiques des biofilms prélevés en fin d'été et soumis à l'exposition chronique au Cu n'a pas été modifiée par la hausse thermique appliquée (+5°C et +10°C). Dans ce contexte, l'exposition au Cu s'est ainsi avérée être le principal facteur d'évolution de la composition diatomique. Pourtant, une augmentation importante du niveau de tolérance au Cu des communautés phototrophes a été observée après 4 semaines à 23°C. D'après les résultats exploratoires obtenus sur la réponse génétique des diatomées à l'exposition multistress, et compte tenu de l'absence de remaniement majeur au niveau de la répartition des classes algales et au sein de la composition diatomique, il semblerait que cette stimulation de la tolérance à 23°C soit plutôt liée à la mise en place de mécanismes de résistance à l'échelle intra-spécifique.

En complément, nos résultats suggèrent que l'influence de la température sur la capacité des communautés phototrophes à s'adapter à une exposition chronique au Cu dépend également du niveau de contamination testé. En effet, à un niveau de contamination réaliste de 15 µg L⁻¹, les niveaux de hausse thermique testés ont eu un effet neutre (Chapitre VI) voire bénéfique (Chapitre III) sur cette capacité d'adaptation, selon les propriétés initiales des biofilms étudiés. En revanche, à un niveau de contamination 4 fois plus élevé (i.e. 60 µg L⁻¹), la hausse thermique de +10°C semble avoir fortement fragilisé les communautés phototrophes, qui se sont montrées incapables de s'adapter à ce niveau d'exposition chronique au Cu dans ce contexte (Chapitre IV). Par conséquent, il semblerait qu'à un niveau de contamination moins élevé, les communautés phototrophes puissent être co-tolérantes aux deux facteurs de

stress appliqués. À l'inverse, dans le cadre d'une contamination plus élevée, les communautés phototrophes n'ont pas pu s'adapter au Cu lorsque l'exposition aux deux stress était simultanée. Dans ce contexte de contamination élevée, les niveaux de tolérance de ces communautés au Cu étaient même légèrement inférieurs à ceux mesurés pour les communautés non exposées chroniquement à ce toxique et soumises à la même température.

Ainsi, une augmentation de la température, dans le cadre d'une contamination élevée au Cu, peut compromettre les capacités d'adaptation des communautés phototrophes à l'exposition chronique au Cu. Cette adaptation représente pourtant la base fondamentale du concept « PICT ». Ainsi, nous pouvons nous interroger sur les « effets seuils » des niveaux d'exposition métallique et thermique, en dessous desquels l'interaction entre ces deux facteurs de stress serait de type « antagoniste » (i.e. interaction de type $1+1<2$), et au dessus desquels l'interaction entre ces deux facteurs de stress serait de type « synergique » (i.e. interaction de type $1+1>2$).

De plus, ces résultats suggèrent un rôle important des assemblages de diatomées dans la co-tolérance des communautés phototrophes à l'exposition multistress (Cu et température). En effet, nous avons observé, d'une part, que l'augmentation de la température a induit une modification de la composition des assemblages diatomiques dans les biofilms prélevés en hiver, avec le développement d'espèces plus tolérantes au Cu, et en parallèle une diminution des effets du Cu observée sur les paramètres structuraux et fonctionnels des communautés phototrophes (Chapitre III). D'autre part, la hausse thermique n'a pas eu d'effet sur la composition des assemblages de diatomées dans les biofilms d'été, n'entraînant en conséquence qu'une faible modulation de l'adaptation des communautés phototrophes au Cu selon le contexte thermique (Chapitre VI). Enfin, dans le cadre d'une exposition chronique plus élevée, qui a conduit à une élimination quasi totale de diatomées, l'augmentation de la température a fragilisé la communauté phototrophe, composée principalement d'algues vertes et de cyanobactéries, qui n'ont pas pu s'adapter au Cu dans ce contexte (Chapitre IV).

Concernant le compartiment hétérotrophe, les mesures ont été réalisées uniquement à partir des biofilms prélevés en été. Les résultats ont montré que l'exposition chronique au Cu à la température du milieu a bien induit une augmentation des niveaux de tolérance à ce métal. Cette acquisition de tolérance a été principalement visible à partir des tests de toxicité réalisés en ciblant l'activité β -Glu. Sur la base de cette activité, la température n'a pas eu d'influence sur l'acquisition de tolérance mesurée, alors que les tests de toxicité réalisés sur l'activité Lap ont mis en évidence une légère diminution des niveaux de tolérance des communautés exposées chroniquement au Cu dans un contexte de hausse thermique de $+10^{\circ}\text{C}$ (Chapitre VI).

1.2.2 La température peut influencer la sensibilité basale des communautés microbiennes périphytiques au cuivre

Les capacités d'une communauté microbienne à tolérer un stress métallique, et donc son niveau de 'vulnérabilité', dépendent de ses propriétés initiales, en particulier de sa composition et du niveau de sensibilité des espèces présentes.

Au regard de la variabilité de la sensibilité des communautés phototrophes à l'exposition aiguë au Cu, à une même température donnée, selon la communauté microbienne initiale (i.e. biofilms prélevés au printemps, Chapitre IV, et en fin d'été, Chapitre VI), nous pouvons fortement supposer une influence de la composition initiale du biofilm sur les niveaux de tolérance basale que nous avons mesurés.

De plus, il a été montré que la tolérance basale des communautés microbiennes phototrophes pouvait être modulée par de nombreux facteurs environnementaux, tels que la lumière ou les conditions hydrodynamiques (Guasch and Sabater, 1998 ; Villeneuve *et al.* 2010). Or, dans nos travaux, l'évaluation des niveaux de sensibilité au Cu des communautés non exposées à ce toxique et soumises à différents niveaux de température a permis d'évaluer l'influence de la température sur les niveaux de tolérance basale. Concernant le compartiment phototrophe, nous n'avons ainsi observé qu'un effet limité de la hausse thermique sur les niveaux de sensibilité mesurés, puisque les variations observées à ce niveau en fonction de la température testée n'ont été que transitoires ou non significatives. À l'inverse, une influence marquée d'une augmentation de la température a été observée sur la sensibilité des communautés hétérotrophes au Cu, suggérant ainsi que ce paramètre environnemental est susceptible de moduler la capacité de ce compartiment microbien à tolérer une exposition subséquente.

Cependant, la magnitude et la direction de l'influence d'une hausse de la température sur la sensibilité des communautés hétérotrophes de biofilms à l'exposition aiguë au Cu se sont montrées variables selon le descripteur fonctionnel considéré. En effet, nous avons observé, avec la hausse de la température, une diminution de la sensibilité sur la base de la mesure de l'activité β -Glu, et à l'inverse, une augmentation de la sensibilité sur la base de la mesure de l'activité Lap. Ces résultats soulignent, d'une part, la nécessité, déjà mise en lumière par Tlili *et al.* (2010), d'utiliser différents descripteurs fonctionnels pour évaluer la sensibilité globale du biofilm, et d'autre part, ils révèlent un risque de perturbation des processus microbiens si certaines fonctions s'avèrent plus vulnérables que d'autres, ce qui pourrait engendrer, à terme, un risque de dysfonctionnement de l'écosystème.

De manière plus générale, ces résultats ramènent à la notion « de coût de la tolérance », proposée par différents auteurs, concernant les expositions multistress (ex : Moe *et al.* 2013). En effet, une exposition à un premier stress, peut mener à une tolérance des communautés à celui-ci. Cependant, le coût de cette tolérance peut entraîner la diminution des capacités de tolérance à un stress additionnel. Ceci peut s'expliquer par le fait que le premier stress ayant induit l'élimination des espèces les moins tolérantes (et la sélection des espèces les plus tolérantes), cela a engendré une diminution de la diversité, augmentant ainsi la vulnérabilité de la communauté biologique à un stress additionnel (Pain *et al.* 1998).

1.2.3 La température peut influencer l'exposition des communautés phototrophes de biofilm au cuivre

L'influence de la température sur les niveaux de bioaccumulation du Cu varie selon les expérimentations réalisées. En effet, nous avons observé une diminution des niveaux de bioaccumulation du Cu avec l'augmentation de la température, pour le biofilm prélevé en hiver (Fig VII.1.), alors que la bioaccumulation du Cu ne variait pas pour le biofilm prélevé en fin d'été, quel que soit le contexte thermique testé (Fig VII.2.).

L'influence de la température sur la bioaccumulation du Cu varie selon les propriétés spécifiques du biofilm et, notamment, selon le développement de la matrice EPS. À une température commune de 18°C, le poids sec du biofilm prélevé en fin d'été était 1000 fois supérieur à celui du biofilm prélevé en hiver. La matrice EPS représentant environ 90% du biofilm (voir Chapitre I. §1.1.2.), ces résultats suggèrent donc une biodilution des concentrations en Cu due au développement plus important de la matrice EPS pour les biofilms prélevés en fin d'été. Pour ce type de biofilm, le développement de cette matrice a été important quelle que soit la température testée, ce qui peut expliquer l'absence d'influence de la température sur les niveaux de bioaccumulation du Cu dans ce contexte (Fig VII.2.). De plus, le développement plus important de la matrice EPS, quelle que soit la température testée, a sans doute permis de protéger les cellules microbiennes de l'internalisation du Cu, et par conséquent de la toxicité métallique. Cela peut donc expliquer l'influence très limitée de la température sur les effets du Cu observés sur la structure et la fonction, mais aussi sur l'adaptation des communautés phototrophes à ce toxique (Fig VII.2.). Concernant les biofilms prélevés en hiver, l'augmentation de la température a certainement favorisé le développement de la matrice EPS au regard de l'augmentation de la biomasse algale observée dans le cadre

de l'exposition chronique au Cu. Un développement croissant de la matrice EPS, avec l'augmentation de la température, a probablement entraîné en contrepartie une biodilution du Cu, plus importante aux températures les plus élevées. Cette hypothèse est en accord avec la diminution observée des concentrations en Cu bioaccumulé avec l'augmentation de la température (mais avec, probablement, une quantité plus élevée de Cu complexé aux EPS) (Fig VII.1.).

D'autre part, les conditions physico-chimiques peuvent moduler l'exposition des communautés de biofilm au Cu. C'est le cas en particulier du pH, puisqu'il a été largement décrit dans la littérature que les processus de sorption métallique sont conditionnés majoritairement par les variations de pH intra-journalières, liées aux activités métaboliques des biofilms phototrophes (Nimick *et al.* 2003 ; Morris *et al.* 2005; Beck *et al.* 2009). Ainsi, dans l'étude réalisée avec les communautés microbiennes prélevées en fin d'été, les fortes valeurs de pH, mesurées dans les microcosmes aux trois températures testées, ont probablement limité la biodisponibilité du Cu. Ces fortes valeurs de pH sont attribuables à l'activité photosynthétique importante du biofilm, du fait notamment des fortes biomasses qui se sont développées dans les microcosmes. Cette hypothèse de réduction de la biodisponibilité du Cu est appuyée par les faibles concentrations en Cu labile, mesurées par DGT, tout au long des 4 semaines d'expérimentation (i.e. entre 1,3 et 2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$, quel que soit le contexte thermique), le Cu labile représentant la forme dissoute la plus biodisponible pour les organismes (Deaver and Rodgers, 1996). Ainsi, les concentrations en Cu labile représentaient moins de 10% des concentrations totales dissoutes.

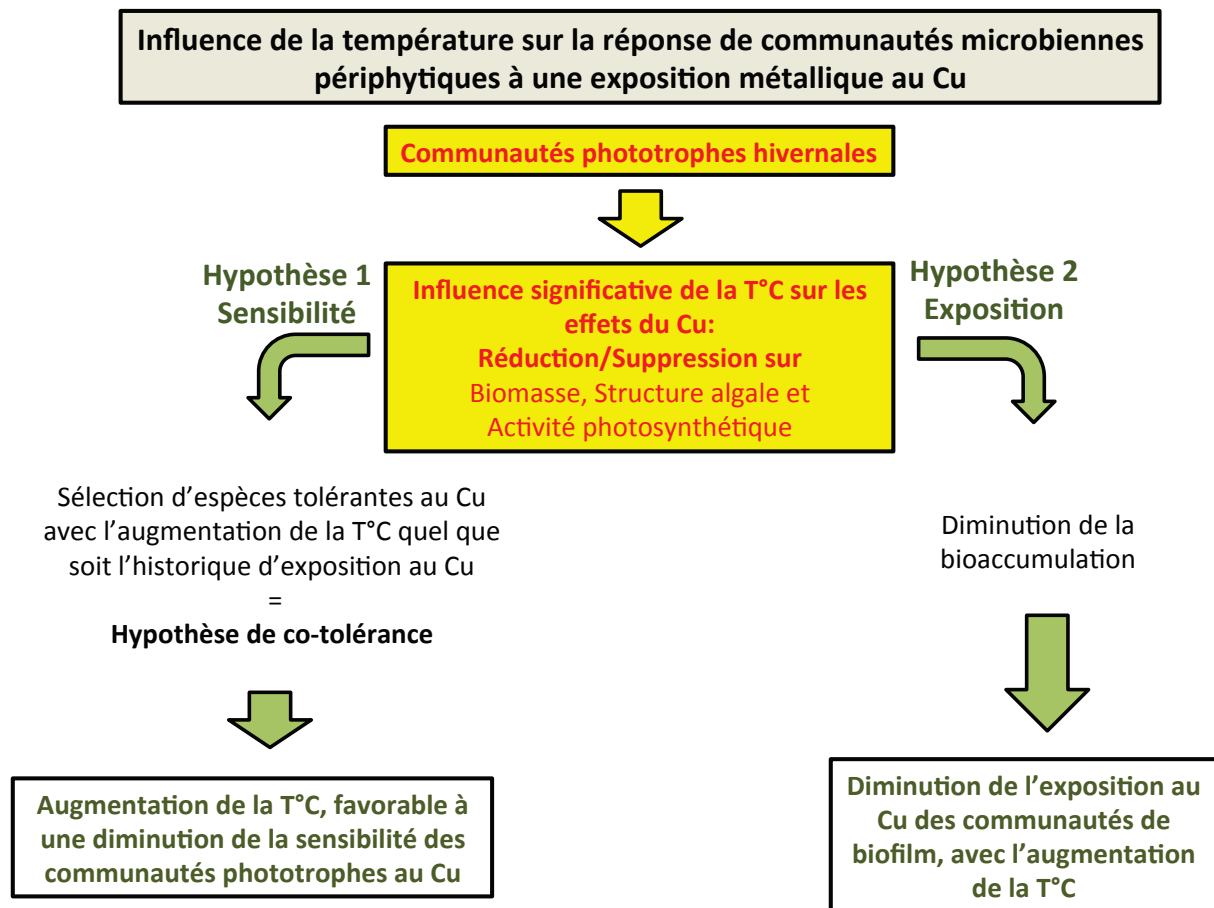


Figure VII.1. Bilan des résultats obtenus sur l'influence de la température sur la réponse des communautés phototrophes de biofilm hivernal au Cu. En rouge sur fond jaune, les réponses aux questions posées en début de thèse. En vert sur fond blanc, les réponses apportées aux hypothèses soulevées.

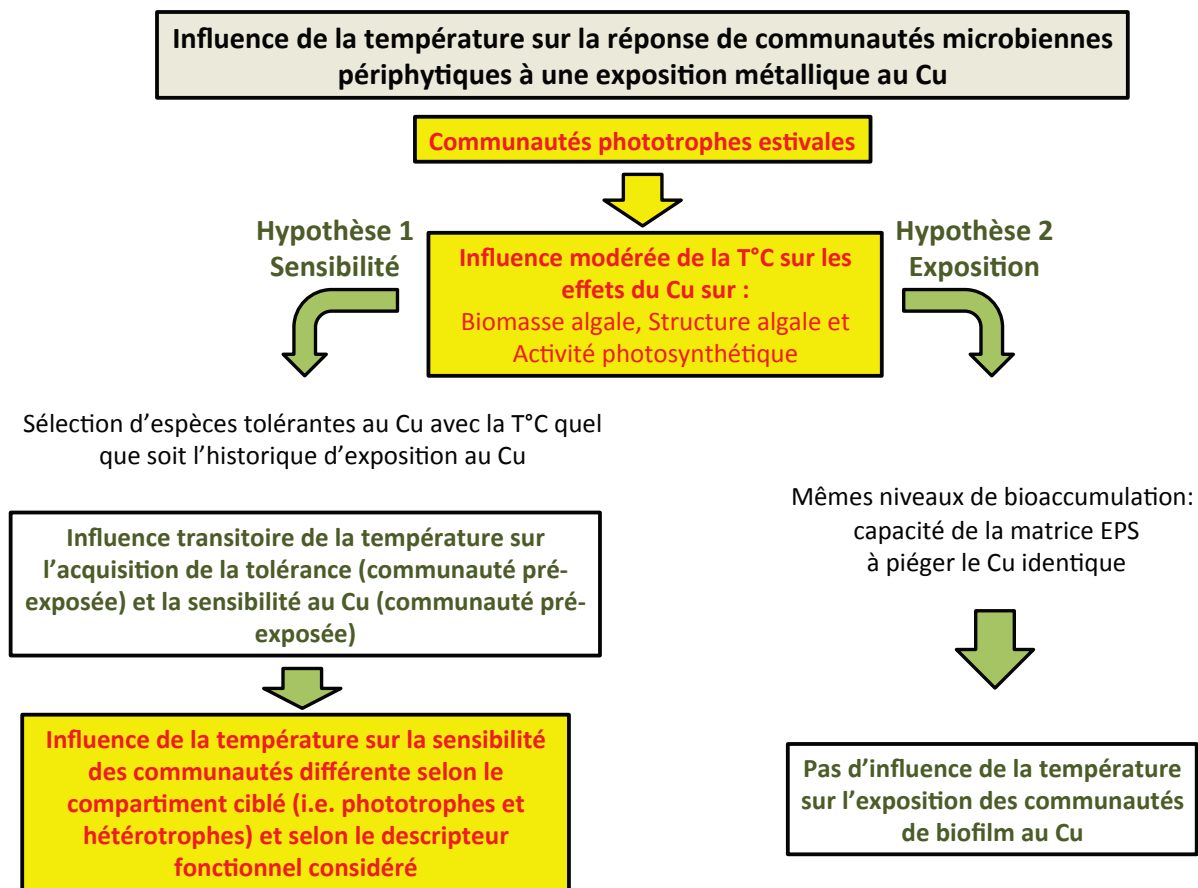


Figure VII.2. Bilan des résultats obtenus sur l'influence de la température sur la réponse des communautés phototrophes et hétérotrophes de biofilm estival au Cu. En rouge sur fond jaune, les réponses aux questions posées en début de thèse. En vert sur fond blanc, les réponses apportées aux hypothèses soulevées.

2. Perspectives

Dans cette thèse, nous avons mis en évidence une influence variable de la température sur la réponse du biofilm au Cu selon les caractéristiques intrinsèques de la communauté microbienne, telles que la composition (i.e. diversité, classes algales), qui conditionne la tolérance des communautés à ce métal, et sa structure physique (i.e. matrice EPS), qui conditionne les niveaux d'exposition des communautés (en fonction du niveau de contamination du milieu).

2.1. Évaluation de la tolérance des communautés aux contaminants, dans un contexte multistress

Afin d'améliorer notre capacité à prédire la réponse des communautés microbiennes aux stress auxquels elles sont exposées, il est primordial de comprendre comment les facteurs écologiques conditionnent la tolérance de ces communautés. Dans notre contexte d'étude, l'influence de la température sur la tolérance des communautés de biofilm au Cu dépendait, entre autres, du niveau d'exposition chronique des communautés à ce toxique (i.e. pas de contamination / contamination réaliste / contamination forte). D'autre part, nous avons montré que l'influence de la température sur les niveaux de tolérance basale (communautés non-exposées) et sur l'acquisition de tolérance (communautés exposées) au Cu présentait une magnitude et/ou une direction variables selon (i) la communauté microbienne initiale, (ii) le compartiment microbien étudié et le descripteur fonctionnel considéré. Ainsi, la résultante de l'effet combiné des deux facteurs de stress peut être « antagoniste », « neutre », ou « synergique » et donc être favorable ou défavorable à la communauté microbienne. De même, lorsque l'exposition au stress thermique et toxique n'est pas simultanée, l'augmentation de la température peut donc fragiliser les communautés microbiennes, ou au contraire favoriser leur capacité à tolérer le stress additionnel provoqué par une exposition subséquente au Cu.

Ces résultats soulignent donc l'importance des phénomènes de tolérances croisées, puisque la réponse de la communauté à un stress appliqué peut dépendre fortement de la tolérance ou de la sensibilité induite par un stress antérieur. Ainsi, on parle de co-tolérance positive, lorsque le premier stress réduit l'impact du second (i.e. stress-induced community tolerance), et de co-tolérance négative lorsque le second stress induit un effet additif ou synergique (i.e. stress-induced community sensitivity) (Vinebrooke *et al.* 2004).

Dans ce contexte, et pour mieux appréhender cette notion de tolérances croisées, il serait donc intéressant de tester différents scénarios d'exposition séquentielle. Dans une

synthèse bibliographique concernant l'étude des interactions entre les contaminants et les facteurs environnementaux, Holmstrup *et al.* (2010) ont souligné l'importance d'étudier les interactions en fonction des séquences d'exposition aux différents stress (chimique et thermique). Ainsi, nous pourrions envisager d'appréhender la variabilité potentielle de la réponse du biofilm en testant l'exposition au stress chimique précédant le stress thermique d'une part, et l'exposition au stress thermique précédant le stress chimique d'autre part.

En outre, afin de mieux appréhender la sensibilité des communautés à une exposition multistress, il serait intéressant d'étudier séparément la tolérance des communautés aux différents stress. Dans notre cas, nous pourrions ainsi utiliser le concept de SICT "Stress-Induced Community Tolerance", en appréhendant les niveaux de tolérance au stress chimique (le Cu), mais aussi les niveaux de tolérance au stress non chimique (la température) (Vinebrooke *et al.* 2004).

D'un point de vue méthodologique, une meilleure compréhension des processus adaptatifs à partir des mesures de tolérance passe encore vraisemblablement par une poursuite de l'optimisation des tests de toxicité aiguë, utilisés dans le cadre de l'approche de PICT. Il semble notamment important de mieux appréhender l'influence possible de la composition du milieu utilisé pour les tests de toxicité aiguë sur les niveaux de tolérance mesurés. Se pose notamment la question de l'importance du pH et de la composition en nutriments, susceptibles de faire varier la biodisponibilité du métal testé, et donc le niveau d'exposition réel des communautés. De plus, Guo *et al.* (2012) ont montré que l'expression de gènes de choc thermique (i.e. Hsp70), chez la dinoflagellée *Prorocentrum minimum*, était induite par une exposition au Cu, si celui-ci était apporté sous forme de CuSO₄, et non sous forme de CuCl₂. Au regard de ce constat, il semble donc également important d'évaluer l'influence de la forme du Cu utilisé dans les tests de toxicité aiguë sur les niveaux de tolérance mesurés.

Au cours de cette thèse, l'optimisation du protocole des tests de toxicité aiguë a été réalisée uniquement sur la base de la réponse des communautés phototrophes de biofilm, par mesure de l'efficacité photosynthétique. Or, dans les cours d'eau, les communautés hétérotrophes ont des fonctions tout aussi importantes que celles des communautés phototrophes, tels que la dégradation de la MO et le recyclage des nutriments (Battin *et al.* 2003), et nous avons démontré l'importance de considérer différents compartiments microbiens et différentes fonctions dans les approches « PICT ». C'est pourquoi il est primordial d'améliorer aussi l'évaluation de la tolérance des communautés hétérotrophes à

l'exposition multistress, et donc d'optimiser les tests de toxicité aiguë, utilisés dans le cadre de l'approche de PICT, au regard de la réponse de ce compartiment microbien. En particulier, il nous apparaît important de tester l'influence de la température d'incubation sur les niveaux de tolérance de ce compartiment microbien, car les activités hétérotrophes sont généralement davantage conditionnées par la température que les activités phototrophes (Hancke and Glud, 2004 ; Staehr and Sand-Jensen, 2006).

En outre, nous avons soulevé le fait que les modifications observées au niveau de la tolérance des communautés phototrophes au Cu n'étaient pas toujours liées à des variations au niveau de la répartition des classes algales ou de la composition diatomique (i.e. sélection inter-spécifique).

Ceci soulève donc un questionnement sur les mécanismes d'adaptation mis en jeu dans l'augmentation des niveaux de tolérance. Pour mieux appréhender ces mécanismes, on peut donc s'interroger sur la nécessité de travailler à des niveaux biologiques simplifiés, même si cela diminue le réalisme écologique. Ainsi, il serait intéressant d'envisager de mieux considérer l'écologie des différentes populations de diatomées pour appréhender plus finement les phénomènes de co-tolérances positives ou négatives de la communauté à l'exposition multistress. Se pose notamment, dans notre cas, la question du préférendum thermique des différentes populations diatomiques présentes dans les biofilms étudiés. L'idée de comprendre ou de prédire les conséquences écologiques de l'exposition multistress des écosystèmes à partir de la réponse physiologique de populations isolées, suggérée par Koehl (1989), va dans le sens des approches réductionnistes, utilisées de manière prépondérante en écotoxicologie. Cependant, il faut rappeler qu'il est généralement difficile d'extrapoler à l'échelle de la communauté les observations réalisées aux échelles moins complexes, qu'elles soient cellulaires, individuelles ou populationnelles, du fait d'une propagation non linéaire des effets toxiques lors d'un passage à un niveau d'organisation biologique supérieur (Segner, 2007).

Cependant, une augmentation de la tolérance à un contaminant peut aussi résulter d'une adaptation spécifique de certaines populations microbiennes à celui-ci (i.e. sélection intra-spécifique), sans nécessairement s'accompagner de remaniements marqués dans la communauté. Ainsi, dans le cadre du biofilm prélevé en fin d'été, nous avons analysé l'expression des gènes liés au métabolisme cellulaire chez les diatomées, qui peut être induite ou réprimée pour compenser l'impact des différents stress environnementaux. Ces analyses ont permis d'établir un lien entre l'augmentation de la tolérance des communautés

phototrophes au Cu et l'adaptation spécifique au sein des assemblages de diatomées, dans le cadre d'une augmentation de la température de +5°C.

Ainsi, à l'échelle de la communauté, le couplage des approches (i) génétiques (i.e. étude de la sélection intra-spécifique), (ii) taxonomiques (i.e. étude de la sélection inter-spécifique) et (iii) fonctionnelle (i.e. mesure des niveaux de tolérance à chacun des stress appliqués) permettrait d'avoir une vision plus générale de l'adaptation au stress et des mécanismes impliqués dans les modifications de la sensibilité des communautés microbiennes, tout en conservant une dimension écologique importante.

2.2. Évaluation de l'exposition des communautés aux contaminants, dans un contexte multistress

Nos travaux ont montré que la réponse du biofilm au Cu était aussi conditionnée par l'exposition à ce métal. L'exposition du biofilm au Cu a été évaluée par la mesure des niveaux de bioaccumulation dans les différentes grandes fractions de ce modèle biologique (i.e. intracellulaire ; capsulaire et colloïdale), en intégrant l'ensemble de la période d'exposition du biofilm (i.e. 4 ou 6 semaines, selon la durée des expériences). Or, la caractérisation de l'exposition du biofilm au Cu pourrait être encore améliorée.

En effet, nous pourrions envisager de suivre cette bioaccumulation dans le temps, afin de tracer une toxicocinétique du Cu. Ceci pourrait être réalisé grâce à l'utilisation d'isotopes de marquage. En effet, nous pourrions, dans les premiers temps de l'expérience, contaminer les microcosmes avec un seul isotope du Cu ; puis dans un second temps, contaminer les microcosmes avec un autre isotope de Cu. Ainsi, sur cet exemple de deux isotopes utilisés successivement, nous pourrions suivre en deux temps la fixation du métal au cours du développement du biofilm. Cela devrait permettre de mettre en évidence, selon notre hypothèse, une internalisation du métal dans les cellules microbiennes dans les premiers temps de l'expérience, puis une séquestration du Cu par la matrice EPS, dans un second temps (limitant la pénétration du Cu dans les cellules). De cette manière, nous pourrions évaluer l'influence de la température sur cette cinétique d'accumulation du Cu dans le biofilm.

Il serait intéressant aussi d'évaluer le rôle de la MOD sur la biodisponibilité du Cu en fonction du contexte thermique. En effet, 90% du Cu est complexé aux substances humiques dissoutes dans les rivières (Mcknight *et al.* 1983), limitant la biodisponibilité métallique. Cependant, dans notre contexte d'étude, la MOD est exclusivement d'origine microbienne (i.e. allochtone), et donc très pauvre en substances humiques. Il serait donc intéressant d'évaluer

l'influence de la température sur la réponse du biofilm au Cu, en présence de MOD d'origine allochtone. Pour cela, nous pourrions envisager d'utiliser des eaux reconstituées, contenant différentes qualités et quantités de MOD. Ainsi, concernant la MOD d'origine allochtone, nous pourrions donc appréhender sa capacité de complexation en suivant sa proportion en substances humiques par la mesure du rapport entre le carbone et l'oxygène (autour de 0,5) ; ou bien en mesurant le rapport entre l'adsorbance des cycles aromatiques (caractéristiques des substances humiques) et des concentrations en COD ; ou enfin, plus simplement, en suivant l'émission de la fluorescence de ces substances humiques (émission : 430 - 450 nm ; Masson *et al.* 2011). D'autre part, il est possible de mettre en évidence la complexation du Cu à la MOD par mesure de fluorescence. En effet, la complexation du Cu sur la MOD a pour effet de modifier le signal de fluorescence de la MOD (i.e. diminution de l'intensité du signal). Ce phénomène est appelé extinction de fluorescence (ou quenching) (Lakowicz *et al.* 1983). Ainsi, l'analyse de l'extinction de fluorescence permet de mieux évaluer la biodisponibilité des métaux.

Une autre perspective concerne la mise en évidence de mécanismes de séquestration intracellulaire, telle que la synthèse de métallothionéines (voir Chapitre I, § 2.3.3.). En effet, nous pourrions envisager de doser ces protéines au cours du temps, afin d'évaluer l'influence de la température sur la mise en place de ce mécanisme de détoxification cellulaire.

Enfin, l'évaluation de l'exposition du biofilm au Cu pourrait être améliorée grâce à l'utilisation d'autres méthodes d'analyse, permettant d'étudier plus spécifiquement la spéciation et la biodisponibilité du Cu, telles que :

- La microscopie électronique à balayage (i.e. MEB ou SEM), couplée à une analyse dispersive en énergie (EDS ou EDX), qui permet de mettre en évidence la séquestration du Cu par les EPS (Burgos *et al.* 2012). Cependant, cette technique d'analyse a l'inconvénient de devoir être utilisée sur des échantillons déshydratés, modifiant ainsi la conformation du biofilm, contrairement aux méthodes d'analyses décrites ci-dessous.
- Les techniques de microscopie à rayon X, qui utilisent les propriétés d'adsorption des rayons X, émis par une source à synchrotron (accélérateur de particule). La μ -SXRF (Micro Synchrotron-based X-Ray Fluorescence) permette d'obtenir des informations sur la spéciation métallique, puisqu'elle donne une indication sur la nature du complexe formé (ex : Cu-phosphates) et l'abondance de celui-ci en pourcentage. Elle permet aussi de localiser le Cu, au cours du temps, dans l'épaisseur du biofilm (Chen *et al.* 2011). La STXM (Scanning

Transmission X-ray Microscopy), permet de plus, d'obtenir les concentrations des différentes formes du Cu identifiées (Lawrence *et al.* 2012). La figure VII.3. donne un exemple d'image obtenue par STXM.

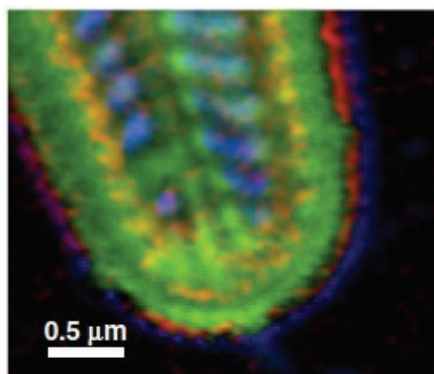


Figure VII.3. Adsorption du Cu à la surface d'une diatomée de biofilm de rivière, vue par STXM. Le Cu^{2+} est représenté en rouge. Celui-ci est adsorbé à la frustule de la diatomée et, dans une moindre mesure, internalisé dans le cytoplasme de la cellule. En vert, sont représentés les constituants lipidiques et en bleu les polysaccharides (Lawrence *et al.* 2012).

- L'imagerie par résonance magnétique (IRM) permet de localiser le Cu et de suivre au cours du temps sa diffusion dans le biofilm (Phoenix and Holmes, 2008), et rejoint en ce sens la technique de microscopie à rayons X.

BIBLIOGRAPHIE

A

- D'Abzac P, Bordas F, Joussein E, Hullebusch EV, Lens PN, Guibaud G (2009) Characterization of the mineral fraction associated to extracellular polymeric substances (EPS) in anaerobic granular sludges. *Environmental science and technology* 44 : 412-418
- D'Abzac P, Bordas F, Van Hullebusch E, Lens PN, Guibaud G (2010) Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from anaerobic granular sludges : comparison of chemical and physical extraction protocols. *Applied microbiology and biotechnology* 85 : 1589-1599
- Acuna V, Wolf A, Uehlinger U, Tockner K (2008) Temperature dependence of stream benthic respiration in an Alpine river network under global warming. *Freshwater Biology* 53 : 2076-2088
- Adams MS, Stauber JL (2004) Development of a whole-sediment toxicity test using a benthic marine microalga. *Environmental toxicology and chemistry* 23 : 1957-1968
- Aguilera A, Souza-Egipsy V, San Martín-Úriz P, Amils R (2008) Extraction of extracellular polymeric substances from extreme acidic microbial biofilms. *Applied microbiology and biotechnology* 78 : 1079-1088
- Ahuja P, Gupta R, Saxena RK (1999) Zn^{2+} biosorption by *Oscillatoria angustissima*. *Process Biochemistry* 34 : 77-85
- Allison DG, Sutherland IW, Neu TR (2003) EPS : what's an acronym. *Biofilm communities : order from chaos ?* Bioline, Cardiff 381-387
- Alsterberg C, Sundbäck K (2013) Experimental warming and toxicant exposure can result in antagonistic effects in a shallow-water sediment system. *Marine Ecology-Progress Series* 488 : 89-101

- Amiard-Triquet C, Berthet B, Joux L, Perrein-Ettajani H (2006) Significance of physicochemical forms of storage in microalgae in predicting copper transfer to filter-feeding oysters (*Crassostrea gigas*). *Environmental toxicology* 21 : 1-7
- Amon RM, Benner R (1996) Bacterial utilization of different size classes of dissolved organic matter. *Limnology and Oceanography* 41 : 41-51
- Amon RM, Benner R (1994) Rapid cycling of high-molecular-weight dissolved organic matter in the ocean. *Nature* 369 : 549-552
- Anderson MJ (2001) A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology* 26 : 32-46
- Arnegard ME, McCormick PV, Cairns JrJ (1998) Effects of copper on periphyton communities assessed in situ using chemical-diffusing substrates. *Hydrobiologia* 385 : 163-170
- Atazadeh I, Kelly M, Sharifi M, Beardall J (2009) The effects of copper and zinc on biomass and taxonomic composition of algal periphyton communities from the River Gharasou, Western Iran. *Oceanological and hydrobiological Studies* 38 : 3-14
- Azim ME, Verdegem MC, van Dam AA, Beveridge MC (Eds.) (2005) *Periphyton : ecology, exploitation and management*. CABI

B

- Barman TE (1969) *Enzyme handbook*, Berlin, New York : Springer-Verlag 928
- Barón M, Arellano JB, Gorgé JL (1995) Copper and photosystem II : a controversial relationship. *Physiologia Plantarum* 94 : 174-180
- Barranguet C, Charantoni E, Plans M, Admiraal W (2000) Short-term response of monospecific and natural algal biofilms to copper exposure. *European Journal of Phycology* 35 : 397-406

- Barranguet C, Plans M, van der Grinten E, Sinke JJ, Admiraal W (2002) Development of photosynthetic periphyton affected by dissolved and sorbed copper in a eutrophic river. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21 : 1955-1965
- Barranguet C, van den Ende FP, Rutgers M, Breure AM, Greijdanus M, Sinke JJ, Admiraal W (2003) Copper-induced modifications of the trophic relations in riverine algal-bacterial biofilms. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22 : 1340-1349
- Barriuso E (2004) Estimation des risques environnementaux des pesticides. Editions Quae, p11
- Bassler BL, Losick R (2006) Bacterially speaking. *Cell* 125 : 237-246
- Battin TJ, Kaplan LA, Newbold JD, Hansen CM (2003) Contributions of microbial biofilms to ecosystem processes in stream mesocosms. *Nature* 426 : 439-442
- Baulch HM, Schindler DW, Turner MA, Findlay DL, Paterson MJ, Vinebrooke RD (2005) Effects of warming on benthic communities in a boreal lake: implications of climate change. *Limnology and Oceanography* 50 : 1377-1392
- Beck AJ, Janssen F, Polerecky L, Herlory O, de Beer D (2009) Phototrophic biofilm activity and dynamics of diurnal Cd cycling in a freshwater stream. *Environmental science and technology* 43 : 7245-7251
- Beniston M, Stephenson DB, Christensen OB, Halsnaes K, Holt T, Jylhä K, Koffi B, Palutikof J, Schöll R, Semmler T, Woth K (2007) Future extreme events in European climate : an exploration of regional climate model projections. *Climatic Change* 81: 71-95
- Bérard A, Dorigo U, Mercier I, Becker-van Slooten K, Grandjean D, Le Boulanger C (2003) Comparison of the ecotoxicological impact of the triazines Irgarol 1051 and atrazine on microalgal cultures and natural microalgal communities in Lake Geneva. *Chemosphere* 53 : 935-944
- Bérard A, Pelte T, Druart JC (1999) Seasonal variations in the sensitivity of Lake Geneva phytoplankton community structure to atrazine. *Archiv Fur Hydrobiologie* 145 : 277-295

- Berggren M, Laudon H, Jonsson A, Jansson M (2010) Nutrient constraints on metabolism affect the temperature regulation of aquatic bacterial growth efficiency. *Microbial Ecology* 60 : 894-902
- Bhaskar PV, Bhosle NB (2006) Bacterial extracellular polymeric substance (EPS) : A carrier of heavy metals in the marine food-chain. *Environment International* 32 : 191-198
- Blanchard GF, Guarini JM, Richard P, Gros P, Mornet F (1996) Quantifying the short-term temperature effect on light-saturated photosynthesis of intertidal microphytobenthos. *Marine Ecology-Progress Series* 134 : 309-313
- Blanck H (2002) A critical review of procedures and approaches used for assessing pollution-induced community tolerance (PICT) in biotic communities. *Human Ecology Risk Assess* 8 : 1003-1034
- Blanck H, Admiraal W, Cleven RFMJ, Guasch H, van den Hoop MAGT, Ivorra N, Nystrom B, Paulsson M, Petterson RP, Sabater S, Tubbing GMJ (2003) Variability in zinc tolerance, measured as incorporation of radio-labeled carbon dioxide and thymidine, in periphyton communities sampled from 15 European river stretches. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 44 : 17-29
- Blanck H, Dahl B (1996) Pollution-induced community tolerance (PICT) in marine periphyton in a gradient of tri-n-butyltin (TBT) contamination. *Aquatic Toxicology* 35 : 59-77
- Blanck H, Wangberg SA (1988) Induced community tolerance in marine periphyton established under arsenate Stress. *Canadian Journal of Fisheries Aquatic Sciences* 45 : 1816-1819
- Blanck H, Wängberg SA, Molander S (1988) Pollution-induced community tolerance – A new ecotoxicological tool. In: Cairns J, Pratt JR (eds) *Functional testing of aquatic biota for estimating hazards of chemicals*, Vol STP 988. American Society for Testing and Materials, Philadelphia : 219-230
- Blindauer CA, Harrison MD, Robinson AK, Parkinson JA, Bowness PW, Sadler PJ, Robinson NJ (2002) Multiple bacteria encode metallothioneins and SmtA-like zinc fingers. *Molecular microbiology* 45 : 1421-1432

- Blinn DW, Truitt R, Pickart A (1989) Response of epilithic diatom communities from the tailwaters of Glen Canyon Dam, Arizona, to elevated water temperature. *Regulated Rivers-Research and Management* 4 : 91-6
- Boivin MEY, Greve GD, Garcia-Meza JV, Massieux B, Sprenger W, Kraak MHS, Breure AM, Rutgers M, Admiraal W (2007) Algal-bacterial interactions in metal contaminated floodplain sediments. *Environmental Pollution* 145 : 884-894
- Boivin MY, Massieux B, Breure AM, van den Ende FP, Greve GD, Rutgers M, Admiraal W (2005) Effects of copper and temperature on aquatic bacterial communities. *Aquatic Toxicology* 71 : 345-356
- Bonet B, Corcoll N, Acuña V, Sigg L, Behra R, Guasch H (2013) Seasonal changes in antioxidant enzyme activities of freshwater biofilms in a metal polluted Mediterranean stream. *Science of the total environment* 444 : 60-72
- Bonnineau B (2011) Contribution of antioxidant enzymes to toxicity assessment in fluvial biofilms. Master's Thesis, University of Girona, Catalonia (Spain)
- Boston HL, Hill WR (1991) Photosynthesis-light relations of stream periphyton communities. *Limnology and oceanography* 36 : 644-656
- Bothwell ML, Sherbot D, Roberge AC, Daley RJ (1993) Influence of natural ultraviolet radiation on lotic periphytic diatom community growth, biomass accrual, and species composition: short-term VERSUS LONG-TERM EFFECTS¹, 2. *Journal of Phycology* 29 : 24-35
- Boulêtreau S, Salvo E, Lyautey E, Mastrorillo S, Garabetian F (2012) Temperature dependence of denitrification in phototrophic river biofilms. *Science of the Total Environment* 416 : 323-328
- Bourassa N, Cattaneo A (1998) Control of periphyton biomass in Laurentian streams (Québec). *Journal of the North American Benthological Society* 420-429
- Branger A (2012) *Microbiochimie et alimentation*. Editions Educagri, p131
- Briandet R, Fechner L, Naïtali M, Dreanno C (2012) *Biofilms, quand les microbes s'organisent*. Editions Quae, p108

Brick CM, Moore JN (1996) Diel variation of trace metals in the upper Clark Fork River, Montana. *Environmental science and technology* 30 : 1953-1960

Bruins MR, Kapil S, Oehme FW (2000) Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicology and environmental safety* 45 : 198-207

Burgos Á, Seder-Colomina M, Maldonado J, Solé A, Esteve I (2012) Scanning Electron Microscopy coupled to an Energy Dispersive X-ray detector to study copper removal on different phototrophic microorganisms. *Current Microscopy Contributions to Advances in Science and Technology, Microscopy Book Series 1* : 222-229

C

Calvet R (2005) Les pesticides dans le sol : Conséquences agronomiques et environnementales. Editions France Agricole, p161

Campbell PGC (1995) Interactions between trace metals and organisms : critique of the free-ion activity model. In *Metal speciation and bioavailability in aquatic systems*. Edited by A. Tessier and D.R. Turner. John Wiley and Sons, Ltd, Chichester, U.K : 45–102

Campbell PG, Chapman PM, Hale BA (2006) Risk assessment of metals in the environment. *Environmental Science and Technology* 22 : 102-131

Carpenter PD, Butler ECV, Higgins HW, Mackey DJ, Nichols PD (1991) Chemistry of trace elements, humic substances and sedimentary organic matter in Macquarie Harbour, Tasmania. *Marine and Freshwater Research* 42 : 625-654

Chappell KR, Goulder R (1994) Enzymes as river pollutants and the response of native epilithic extracellular-enzyme activity. *Environmental pollution* 86 : 161-169

Characklis WG, McFeters GA, Marshall KC (1990) Physiological ecology in biofilm systems. *Biofilms* 37 : 67-72

Chen G, Chen X, Yang Y, Hay AG, Yu X, Chen Y (2011) Sorption and distribution of copper in unsaturated *Pseudomonas putida* CZ1 biofilms as determined by X-ray fluorescence microscopy. *Applied and environmental microbiology* 77 : 4719-4727

- Christensen MR, Graham MD, Vinebrooke RD, Findlay DL, Paterson MJ, Turner MA (2006) Multiple anthropogenic stressors cause ecological surprises in boreal lakes. *Global Change Biology* 12 : 2316-2322
- Chróst RJ (1991) Environmental control of the synthesis and activity of aquatic microbial ectoenzymes. In *Microbial enzymes in aquatic environments*. Springer New York : 29-59
- Chróst RJ (1990) Microbial ectoenzymes in aquatic environments. In *Aquatic microbial ecology*. Springer New York : 47-78
- Chróst RJ (1992) Significance of bacterial ectoenzymes in aquatic environments. In *The Dynamics and Use of Lacustrine Ecosystems*. Springer Netherlands : 61-70
- Cid A, Herrero C. O. N. C. E. P. C. I. Ó. N, Abalde J.U.L. I. O. (1996) Functional analysis of phytoplankton by flow cytometry : a study of the effect of copper on a marine diatom. *Scientia Marina* 60 : 303-308
- Cid A, Herrero C, Torres E, Abalde J (1995) Copper toxicity on the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum* : effects on photosynthesis and related parameters. *Aquatic Toxicology* 31 : 165-174
- Comte S, Guibaud G, Baudu M (2006) Biosorption properties of extracellular polymeric substances (EPS) resulting from activated sludge according to their type: soluble or bound. *Process Biochemistry* 41 : 815-823
- Comte S, Guibaud G, Baudu M (2006) Relations between extraction protocols for activated sludge extracellular polymeric substances (EPS) and EPS complexation properties: Part I. Comparison of the efficiency of eight EPS extraction methods. *Enzyme and Microbial Technology* 38 : 237-245
- Cooke WB (1956) Colonization of artificial bare areas by microorganisms. *The Botanical Review* 22 : 613-638
- Crain CM, Kroeker K, Halpern BS (2008) Interactive and cumulative effects of multiple human stressors in marine systems. *Ecology letters* 11 : 1304-1315

Croot PL, Moffett JW, Brand LE (2000) Production of extracellular Cu complexing ligands by eucaryotic phytoplankton in response to Cu stress. *Limnology and oceanography* 45 : 619-627

Culp JM, Lowell RB, Cash KJ (2000) Integrating mesocosm experiments with field and laboratory studies to generate weight-of-evidence risk assessments for large rivers. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19 : 1167-1173

D

Dahl B, Blanck H (1996) Toxic effects of the antifouling agent Irgarol 1051 on periphyton communities in coastal water microcosms. *Marine Pollution Bulletin* 32 : 342-350

Dallas H (2008) Water temperature and riverine ecosystems: An overview of knowledge and approaches for assessing biotic responses, with special reference to South Africa. *Water Sa* 34 : 393-404

Deaver E, Rodgers JH (1996) Measuring bioavailable copper using anodic stripping voltammetry. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15 : 1925-1930

Debelius B, Forja JM, DelValls Á, Lubián LM (2009) Toxicity and bioaccumulation of copper and lead in five marine microalgae. *Ecotoxicology and environmental safety* 72 : 1503-1513

Della Bella V, Puccinelli C, Marcheggiani S, Mancini L (2007) Benthic diatom communities and their relationship to water chemistry in wetlands of central Italy. In *Annales de Limnologie-International Journal of Limnology* 43 : 89-99. EDP Sciences

DeNicola DM (1996) Periphyton responses to temperature at different ecological levels. *Algal Ecology: Freshwater Benthic Ecosystems*. Academic Press, San Diego : 149-181

Diaz Villanueva V, Font J, Schwartz T, Romani AM (2011) Biofilm formation at warming temperature: acceleration of microbial colonization and microbial interactive effects. *Biofouling* 27 : 59-71

- Dignac MF, Urbain V, Rybacki D, Bruchet A, Snidaro D, Scribe P (1998) Chemical description of extracellular polymers: implication on activated sludge floc structure. *Water Science and Technology* 38 : 45-53
- Di Pippo F, Ellwood NTW, Guzzon A, Siliato L, Micheletti E, De Philippis R, Albertano PB (2012) Effect of light and temperature on biomass, photosynthesis and capsular polysaccharides in cultured phototrophic biofilms. *Journal of Applied Phycology* 24 : 211-220
- Dong B, Liu X, Dai L, Dai X (2013) Changes of heavy metal speciation during high-solid anaerobic digestion of sewage sludge. *Bioresource technology* 131 : 152-158
- Donlan RM (2002) Biofilms : microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases* 8
- Dorigo U, Bérard A, Rimet F, Bouchez A, Montuelle B (2010) In situ assessment of periphyton recovery in a river contaminated by pesticides. *Aquatic Toxicology* 98 : 396-406
- Duong TT, Morin S, Coste M, Herlory O, Feurtet-Mazel A, Boudou A (2010) Experimental toxicity and bioaccumulation of cadmium in freshwater periphytic diatoms in relation with periphyton maturity. *Science of the Total Environment* 408 : 552-562

E

- EC (European Commission) regulation 473/2002 amending Annexes I, II and VI to Council Regulation (EEC) No 2092/91 on organic production of agricultural products and indications referring there to on agricultural products and food stuffs, and laying down detailed rules as regards the transmission of information on the use of copper compounds
- Eivazi F, Tabatabai MA (1990) Factors affecting glucosidase and galactosidase activities in soils. *Soil Biology and Biochemistry* 22 : 891-897
- Eklund BT, Kautsky L (2003) Review on toxicity testing with marine macroalgae and the need for method standardization - exemplified with copper and phenol. *Marine Pollution Bulletin* 46 : 171-181

- Enshaei M, Khanafari A, Sepahy AA (2010) Metallothionein induction in two species of *Pseudomonas* exposed to cadmium and copper contamination. *Iranian Journal of Environmental Health Science and Engineering* 7 : 287-298
- Espeland EM, Francoeur SN, Wetzel RG (2001) Influence of algal photosynthesis on biofilm bacterial production and associated glucosidase and xylosidase activities. *Microbial Ecology* 42 : 524-530
- Espeland EM, Wetzel RG (2001) Complexation, stabilization, and UV photolysis of extracellular and surface-bound glucosidase and alkaline phosphatase : implications for biofilm microbiota. *Microbial ecology* 42 : 572-585

F

- Faburé J, Dufour M, Autret A, Uher E, Fechner LC (2015) Impact of an urban multi-metal contamination gradient: Metal bioaccumulation and tolerance of river biofilms collected in different seasons. *Aquatic Toxicology* 159 : 276-289
- Fang L, Huang Q, Wei X, Liang W, Rong X, Chen W, Cai P (2010) Microcalorimetric and potentiometric titration studies on the adsorption of copper by extracellular polymeric substances (EPS), minerals and their composites. *Bioresource technology* 101 : 5774-5779
- Fargašová A, Bumbálová A, Havránek E (1999) Ecotoxicological effects and uptake of metals (Cu^+ , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Mo^{6+} , Ni^{2+} , V^{5+}) in freshwater alga *Scenedesmus quadricauda*. *Chemosphere* 38 : 1165-1173
- Fechner LC, Dufour M, Gurlay-France C (2012) Pollution-induced community tolerance of freshwater periphyton: measuring heterotrophic tolerance to Pb using an enzymatic toxicity test. *Ecotoxicology* 21 : 2123-2131
- Fechner LC, Gurlay-Francé C, Tusseau-Vuillemin MH (2011) Low exposure levels of urban metals induce heterotrophic community tolerance: a microcosm validation. *Ecotoxicology* 20 : 793-802

- Fechner LC, Gourlay-Francé C, Uher E, Tusseau-Vuillemin MH (2010) Adapting an enzymatic toxicity test to allow comparative evaluation of natural freshwater biofilms' tolerance to metals. *Ecotoxicology* 19 : 1302-1311
- Ferreira D (2009) Caractérisation de la biodisponibilité de cuivre dans les écosystèmes aquatiques, par échantillonnage passif, bio-indication et modélisation (Doctoral dissertation, Thèse de l'Université Paul Cézanne, Aix-Marseille)
- Finlay JA, Allan VJ, Conner A, Callow ME, Basnakova G, Macaskie LE (1999) Phosphate release and heavy metal accumulation by biofilm-immobilized and chemically-coupled cells of a *Citrobacter* sp. pre-grown in continuous culture. *Biotechnology and bioengineering* 63 : 87-97
- Fischer BB, Pomati F, Eggen RIL (2013) The toxicity of chemical pollutants in dynamic natural systems: The challenge of integrating environmental factors and biological complexity. *Science of the Total Environment* 449 : 253-259
- Fleegeer JW, Carman KR, Nisbet RM (2003) Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. *Science of the Total Environment* 317 : 207-233
- Flemming HC, Wingender J (2010) The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology* 8 : 623-633
- Florence TM (1982) The speciation of trace elements in waters. *Talanta* 29 : 345-364
- Florence TM (1977) Trace metal species in fresh waters. *Water Research* 11 : 681-687
- Florence TM, Batley GE, Benes P (1980) Chemical speciation in natural waters
- Folsom BR, Popescu NA, Wood JM (1986) Comparative study of aluminum and copper transport and toxicity in an acid-tolerant freshwater green alga. *Environmental science and technology* 20 : 616-620
- Foulquier A, Morin S, Dabrin A, Margoum C, Mazzella N, Pesce S (2015) Effects of mixtures of dissolved and particulate contaminants on phototrophic biofilms: new insights from a PICT approach combining toxicity tests with passive samplers and model substances. *Environmental Science and Pollution Research* 22 : 4025-4036

Fournier, J. (2009). Pesticides: Fonctions et Premiers Developpements. Editions Techniques Ingénieur.

Franklin NM, Adams MS, Stauber JL, Lim RP (2001) Development of an improved rapid enzyme inhibition bioassay with marine and freshwater microalgae using flow cytometry. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 40 : 469-480

Frølund B, Palmgren R, Keiding K, Nielsen PH (1996) Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. Water research 30 : 1749-1758

G

Gadd GM (2000) Bioremedial potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization. Current Opinion in Biotechnology 11 : 271-279

Gammons CH, Wood SA, Nimick DA (2005) Diel behavior of rare earth elements in a mountain stream with acidic to neutral pH. Geochimica et Cosmochimica Acta 69 : 3747-3758

García-Meza JV, Barrangue C, Admiraal W (2005) Biofilm formation by algae as a mechanism for surviving on mine tailings. Environmental Toxicology and Chemistry 24 : 573-581

Geiszinger A, Bonnineau C, Faggiano L, Guasch H, Lopez-Daval J, Proia L, Ricart M, Ricciardi F, Romaní A, Rotter S, Muñoz I, Schmitt-Jansen M, Sabater S (2009) The relevance of the community approach linking chemical and biological analyses in pollution assessment. Trends Anal Chem 28 : 619-626

Gold C, Feurtet-Mazel A, Coste M, Boudou A (2003a) Effects of cadmium stress on periphytic diatom communities in indoor artificial streams. Freshwater Biology 48 : 316-328

Gold C, Feurtet-Mazel A, Coste M, Boudou A (2003b) Impacts of Cd and Zn on the development of periphytic diatom communities in artificial streams located along a river

- pollution gradient. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 44 : 189-197
- Gonzalez-Davila M, Santana-Casiano JM, Perez-Pena J, Millero FJ (1995) Binding of Cu (II) to the surface and exudates of the alga *Dunaliella tertiolecta* in seawater. Environmental science and technology 29 : 289-301
- Guasch H, Admiraal W, Sabater S (2003) Contrasting effects of organic and inorganic toxicants on freshwater periphyton. Aquatic Toxicology 64 : 165-175
- Guasch H, Ivorra N, Lehmann V, Paulsson M, Real M, Sabater S (1998) Community composition and sensitivity of periphyton to atrazine in flowing waters: the role of environmental factors. Journal of Applied Phycology 10 : 203-213
- Guasch H, Navarro E, Serra A, Sabater S (2004) Phosphate limitation influences the sensitivity to copper in periphytic algae. Freshwater Biology 49 : 463-473
- Guasch H, Paulsson M, Sabater S (2002) Effect of copper on algal communities from oligotrophic calcareous streams. Journal of Phycology 38 : 241-248
- Guasch H, Sabater S (1998) Light history influences the sensitivity to atrazine in periphytic algae. Journal of Phycology 34 : 233-241
- Guo R, Ebenezer V, Ki JS (2012) Transcriptional responses of heat shock protein 70 (Hsp70) to thermal, bisphenol A, and copper stresses in the dinoflagellate *Prorocentrum minimum*. Chemosphere 89 : 512-520
- Gupta PK, Khangarot BS, Durve VS (1981) The temperature-dependence of the acute toxicity of copper to a fresh-water pond snail, *Viviparus Bengalensis* L. Hydrobiologia 83 : 461-464
- Gustavson K, Petersen S, Pedersen B, Stuer-Lauridsen F, Pedersen S, Wangberg SA (1999) Pollution-Induced Community Tolerance (PICT) in coastal phytoplankton communities exposure to copper. Hydrobiologia 416 : 125-138
- Gustavson K, Wängberg SÅ (1995) Tolerance induction and succession in microalgae communities exposed to copper and atrazine. Aquatic Toxicology 32 : 283-302

Gutnick DL, Bach H (2000) Engineering bacterial biopolymers for the biosorption of heavy metals; new products and novel formulations. *Applied Microbiology and Biotechnology* 54 : 451- 460

Güttinger W 1999 Diatoms on CD-ROM. *Cymbella / Encyonema and Navicula*. - Koeltz Scientific

H

Hancke K, Glud RN (2004) Temperature effects on respiration and photosynthesis in three diatom-dominated benthic communities. *Aquatic Microbial Ecology* 37 : 265-281

Hancke K, Hancke TB, Olsen LM, Johnsen G, Glud RN (2008) Temperature effects on microalgal photosynthesis-light responses measured by O₂ production, pulse-amplitude-modulated fluorescence, and 14C assimilation. *Journal of Phycology* 44 : 501-514

Harding JPC, Whitton BA (1977) Environmental factors reducing the toxicity of zinc to *Stigeoclonium tenue*. *British Phycological Journal* 12 : 17-21

Heugens EHW, Hendriks AJ, Dekker T, van Straalen NM, Admiraal W (2001) A review of the effects of multiple stressors on aquatic organisms and analysis of uncertainty factors for use in risk assessment. *Critical Review in Toxicology* 31 : 247-284

Hill WR (1996) Factors affecting benthic algae effects of light. In : *Algal Ecology Freshwater Benthic Ecosystems* (Eds R.J. Stevenson, M.L. Bothwell and R.L. Lowe) pp121-148. Academic Press, San Diego, U.S.A

Hjorth M, Dahlløf I, Forbes VE (2006) Effects on the function of three trophic levels in marine plankton communities under stress from the antifouling compound zinc pyrithione. *Aquatic Toxicology* 77 : 105-115

Holmstrup M, Bindesbol AM, Oostingh GJ, Duschl A, Scheil V, Kohler HR, Loureiro S, Soares AMVM, Ferreira ALG, Kienle C, Gerhardt A, Laskowski R, Kramarz PE, Bayley M, Svendsen C, Spurgeon DJ (2010) Interactions between effects of

environmental chemicals and natural stressors: A review. *Science of the Total Environment* 408 : 3746-3762

Hoppe HG (1983) Significance of exoenzymatic activities in the ecology of brackish water: measurements by means of methylumbelliferyl-substrates. *Marine Ecology Progress Series* 11 : 299-308

Hudson RJM (1998) Which aqueous species control the rates of trace metal uptake by aquatic biota ? Observations and predictions of non-equilibrium effects. *Science of the Total Environment* 219 : 95-115

I

IFRES 2013. Initiative française pour la recherche en environnement santé (dans les domaines Toxicologie, Ecotoxicologie, Epidémiologie et sciences sociales). Feuille de route Transition Ecologique : 81

Imfeld G, Vuilleumier S (2012) Measuring the effects of pesticides on bacterial communities in soil : a critical review. *European Journal of Soil Biology* 49 : 22-30

INERIS (2003) Approches analytiques pour l'évaluation de la biodisponibilité des métaux dans les milieux aquatiques, Rapport technique. DRC-03-46820-PMo/JL-03.0672

INERIS (2004) Devenir et comportement des métaux dans l'eau : biodisponibilité et modèles BLM. Rapport technique. DRC-03-46822-FLg/JL-03.0693

INERIS (2015) Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques: cuivre et ses dérivés. Consulté le 1er avril 2015 à partir de <http://www.ineris.fr/substances/fr/substance/getDocument/2753>

Interlandi SJ (2002) Nutrient–toxicant interactions in natural and constructed phytoplankton communities: results of experiments in semi-continuous and batch culture. *Aquatic toxicology* 61 : 35-51

IPCC Climate change (2007) Impact, adaptation and vulnerability. Eds Parry ML, Canziani OF, Palutikof JP, van der Linden PJ, Hanson CE

ITAB (2009) Utilisation du cuivre pour la protection des cultures biologiques

Ivorra N, Bremer S, Guasch H, Kraak MHS, Admiraal W (2000) Differences in the sensitivity of benthic microalgae to Zn and Cd regarding periphyton development and exposure history. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19 : 1332-1339

Ivorra N, Hettelaar J, Kraak MH, Sabater S, Admiraal W (2002) Responses of biofilms to combined nutrient and metal exposure. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21 : 626-632

J

Jackson CR, Churchill PF, Roden EE (2001) Successional changes in bacterial assemblage structure during epilithic biofilm development. *Ecology* 82 : 555-566

Jones CA, Nimick DA, McCleskey RB (2004) Relative effect of temperature and pH on diel cycling of dissolved trace elements in Prickly Pear Creek, Montana. *Water, Air, and Soil Pollution*, 153 : 95-113

Jupin H, Lamant A (1997) *La photosynthèse*. Masson, p210

K

Karrasch B, Bormki G, Herzsprung P, Winkler M, Baborowski M (2003) Extracellular enzyme activity in the River Elbe during a spring flood event. *Acta hydrochimica et hydrobiologica* 31 : 307-318

Kawakami SK, Gledhill M, Achterberg EP (2006) Production of phytochelatin and glutathione by marine phytoplankton in response to metal stress. *Journal of Phycology* 42 : 975-998

Keasling JD, Van Dien SJ, Pramanik J (1998) Engineering polyphosphate metabolism in *Escherichia coli*: implications for bioremediation of inorganic contaminants. *Biotechnology and bioengineering* 58 : 231-239

- Khoshmanesh A, Lawson F, Prince IG (1997) Cell surface area as a major parameter in the uptake of cadmium by unicellular green microalgae. *The Chemical Engineering Journal and The Biochemical Engineering Journal* 65 : 13-19
- Kim Tiam S, Feurtet-Mazel A, Delmas F, Mazzella N, Morin S, Daffe G, Gonzalez P (2012) Development of q-PCR approaches to assess water quality : effects of cadmium on gene expression of the diatom *Eolimna minima*. *Water research* 46 : 934-942
- Kim Tiam S (2013) Effets de mélanges de pesticides sur les biofilms périphytiques d'eau douce (Doctoral dissertation, Bordeaux 1)
- Kim Tiam S, Morin S, Pesce S, Feurtet-Mazel A, Moreira A, Gonzalez P, Mazzella N (2014) Environmental effects of realistic pesticide mixtures on natural periphyton communities with different exposure histories. *Science of the Total Environment* 473 : 496-506
- Klotz RL (1992) Factors Influencing Alkaline Phosphatase Activity of Stream Epithelion. *Journal of Freshwater Ecology* 7 : 233-242
- Knauer K, Behra R, Sigg L (1997) Effects of free Cu^{2+} and Zn^{2+} ions on growth and metal accumulation in freshwater algae. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16 : 220-229
- Knezovich JP, Harrison FL, Tucker JS (1981) The influence of organic chelators on the toxicity of copper to embryos of the pacific oyster, *Crassostrea-Gigas*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 10 : 241-249
- Knopper LD, Siciliano SD (2002) A Hypothetical Application of the Pollution-Induced Community Tolerance Concept in Megafaunal Communities Found at Contaminated Sites. *Human and Ecological Risk Assessment* 8 : 1057-1066
- Koehl MAR (1989) Discussion: from individuals to populations. *Perspectives in ecological theory* : 39-53
- Krammer K, Lange-Bertalot H (1986–1991) Bacillariophyceae 1. Teil: Naviculaceae, 2. Teil : Bacillariaceae, Epithemiaceae, Surirellaceae, 3. Teil: Centrales, Fragilariaceae, Eunotiaceae, 4. Teil: Achnanthaceae. In: *Kritische Ergänzungen zu Navicula (Lineolatae) und Gomphonema*. G. Fischer Verlag, Stuttgart

Kundzewicz ZW, Mata LJ, Arnell NW, Doll P, Jimenez B, Miller K, Oki T, Sen Z, Shiklomanov I (2008) The implications of projected climate change for freshwater resources and their management. *Hydrological Sciences Journal* 53 : 3-10

L

Lakowicz JR (1983) Quenching of fluorescence. In *Principles of fluorescence spectroscopy*. Springer US : 257-301

Lambert AS, Morin S, Artigas J, Volat B, Coquery M, Neyra M, Pesce S (2012) Structural and functional recovery of microbial biofilms after a decrease in copper exposure: Influence of the presence of pristine communities. *Aquatic toxicology* 109 : 118-126

Lambert AS, Pesce S, Foulquier A, Gahou J, Coquery M, Dabrin A (2015) Improved short-term toxicity test protocol to assess metal tolerance in phototrophic periphyton : toward standardization of PICT approaches. *Environmental Science and Pollution Research International* 22 : 1-9

Larras F, Lambert AS, Pesce S, Rimet F, Bouchez A, Montuelle B (2013) The effect of temperature and a herbicide mixture on freshwater periphytic algae. *Ecotoxicology and environmental safety* 98 : 162-170

Lau TC, Wu XA, Chua H, Qian PY, Wong PK (2005) Effect of exopolysaccharides on the adsorption of metal ions by *Pseudomonas* sp. CU-1. *Water Science and Technology* 52 : 63-68

Lawrence JR, Dynes JJ, Korber DR, Swerhone GD, Leppard GG, Hitchcock AP (2012) Monitoring the fate of copper nanoparticles in river biofilms using scanning transmission X-ray microscopy (STXM). *Chemical Geology* 329 : 18-25

Lawrence JR, Korber DR, Hoyle BD, Costerton JW, Caldwell DE (1991) Optical sectioning of microbial biofilms. *Journal of bacteriology* 173 : 6558-6567

Lawrence JR, Swerhone GD, Wassenaar LI, Neu TR (2005) Effects of selected pharmaceuticals on riverine biofilm communities. *Canadian journal of microbiology* 51 : 655-669

- Lee K, Tay KL (1998) Measurement of microbial exoenzyme activity in sediments for environmental impact assessment. *Microscale aquatic toxicology : advances techniques and practice*. CRC Press, Boca Raton, FL 219-236
- Le Faucheur S, Behra R, Sigg L (2005) Thiol and metal contents in periphyton exposed to elevated copper and zinc concentrations: a field and microcosm study. *Environmental science and technology* 39 : 8099-8107
- Le Faucheur S, Schildknecht F, Behra R, Sigg L (2006) Thiols in *Scenedesmus vacuolatus* upon exposure to metals and metalloids. *Aquatic toxicology* 80 : 355-361
- Le Jeune AH, Charpin M, Sargos D, Lenain JF, Deluchat V, Ngayila N, Amblard C (2007) Planktonic microbial community responses to added copper. *Aquatic toxicology* 83 : 223-237
- Levy JL, Stauber JL, Jolley DF (2007) Sensitivity of marine microalgae to copper: the effect of biotic factors on copper adsorption and toxicity. *Science of the Total Environment* 387 :141-154
- Li WW, Yu HQ (2014) Insight into the roles of microbial extracellular polymer substances in metal biosorption. *Bioresource technology* 160 : 15-23
- Liu H, Fang H. Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludges. *J Biotechnol* 2002; 95 : 249–56
- Liu Y, Fang HH (2003) Influences of extracellular polymeric substances (EPS) on flocculation, settling, and dewatering of activated sludge
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ $\Delta\Delta$ CT method. *methods* 25 : 402-408
- Loaec M, Olier R, Guezennec J (1997) Uptake of lead, cadmium and zinc by a novel bacterial exopolysaccharide. *Water Research* 31 : 1171-1179
- López-Flores R, Quintana XD, Salvadó V, Hidalgo M, Sala L, Moreno-Amich R (2003) Comparison of nutrient and contaminant fluxes in two areas with different hydrological regimes (Emporda Wetlands, NE Spain). *Water Research* 37 : 3034-3046

Luoma SN, Rainbow PS (2005) Why is metal bioaccumulation so variable? Biodynamics as a unifying concept. *Environmental Science and Technology* 39 : 1921-1931

Luoma SN, Rainbow PS, Luoma S (2008) Metal contamination in aquatic environments: science and lateral management. Cambridge University Press

Lyautey E, Jackson CR, Cayrou J, Rols JL, Garabétian F (2005) Bacterial community succession in natural river biofilm assemblages. *Microbial Ecology* 50 : 589-601

M

Maksymiec W (1997) Effect of copper on cellular processes in higher plants. *Photosynthetica* 34 : 421-342

Marcarelli AM, Wurtsbaugh WA (2006) Temperature and nutrient supply interact to control nitrogen fixation in oligotrophic streams: An experimental examination. *Limnology and Oceanography* 51 : 2278-2289

Massieux BPJC, Boivin MEY, Van Den Ende FP, Langenskiöld J, Marvan P, Barranguet C, Admiraal W, Laanbroek HJ, Zwart G (2004) Analysis of structural and physiological profiles to assess the effects of Cu on biofilm microbial communities. *Applied and environmental microbiology* 70 : 4512-4521

Masson M, Blanc G, Schäfer J, Parlanti E, Le Coustumer P (2011) Copper addition by organic matter degradation in the freshwater reaches of a turbid estuary. *Science of the total environment* 409 : 1539-1549

Mazhoudi S, Chaoui A, Ghorbal MH, El Ferjani E (1997) Response of antioxidant enzymes to excess copper in tomato (*Lycopersicon esculentum*, Mill.). *Plant Science* 127 : 129-137

McKnight DM, Feder GL, Thurman EM, Wershaw RL, Westall JC (1983) Complexation of copper by aquatic humic substances from different environments. *Science of the Total Environment* 28 : 65-76

- Megharaj M, Ragusa SR, Naidu R, Gupta VVSR, Rogers S, Kookana RS, Bolan NS, Adriano DC (2003) Metal-algae interactions: implications of bioavailability. In Bioavailability, toxicity and risk relationships in ecosystems. 4th International Symposium on the Biogeochemistry of Trace Elements, Berkeley, California, USA, 23-26 June 1997. (pp. 109-144). Science Publishers, Inc..
- Mergeay M, Nies DH, Schlegel HG, Charles P, Gerits J (1987) *A. eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metal. *Journal of Bacteriology* 162 : 328-334
- Millward RN, Grant A (2000) Pollution-induced tolerance to copper of nematode communities in the severely contaminated restronguet creek and adjacent estuaries, Cornwall, United Kingdom. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19 : 454-461
- Moe SJ, De Schamphelaere K, Clements WH, Sorensen MT, Van den Brink PJ, Liess M (2013) Combined and interactive effects of global climate change and toxicants on populations and communities. *Environmental Toxicology and Chemistry* 32 : 49-61
- Moisset S, Tiam SK, Feurtet-Mazel A, Morin S, Delmas F, Mazzella N, Gonzalez P (2015) Genetic and physiological responses of three freshwater diatoms to realistic diuron exposures. *Environmental Science and Pollution Research* 22 : 4046-4055
- Molander S, Blanck H (1992) Detection of pollution-induced community tolerance (PICT) in marine periphyton communities established under diuron exposure. *Aquatic Toxicology* 22 : 129-143
- Monteiro CM, Castro PML, Malcata FX (2012) Metal uptake by microalgae: Underlying mechanisms and practical applications. *Biotechnology Progress* 28 : 299-311
- Montuelle B, Dorigo U, Bérard A, Volat B, Bouchez A, Tlili A, Gouy V, Pesce S (2010) The periphyton as a multimetric bioindicator for assessing the impact of land use on rivers : an overview of the Ardières-Morcille experimental watershed (France). *Hydrobiologia* 657 : 123-141
- Morel FMM, Price NM (2003) The biogeochemical cycles of trace metals in the oceans. *Science* 300 : 944-947

- Morelli E, Marangi ML, Fantozzi L (2009) A phytochelatin-based bioassay in marine diatoms useful for the assessment of bioavailability of heavy metals released by polluted sediments. *Environment international* 35 : 532-538
- Morelli E, Scarano G (2004) Copper-induced changes of non-protein thiols and antioxidant enzymes in the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Science* 167 : 289-296
- Moreno-Garrido I, González-Delvalle M, Lubián LM (1997) Acumulación de cobre en microalgas usadas en acuicultura. *Actas del VII Seminario de Química Marina, Servicio de Publicaciones de la Universidad de Cádiz* : 279-286
- Moreno-Garrido I, Lubián LM, Soares AMVM (2000) Influence of cellular density on determination of EC50 in microalgal growth inhibition tests. *Ecotox Environ Safe* 47 : 112-116
- Morin S (2006) Bioindication des effets des pollutions métalliques sur les communautés de diatomées benthiques. *Approches in situ et expérimentales* (Doctoral dissertation, Université Sciences et Technologies-Bordeaux I)
- Morin S, Bonet B, Corcoll N, Guasch H, Bottin M, Coste M (2015) Cumulative Stressors Trigger Increased Vulnerability of Diatom Communities to Additional Disturbances. *Microbial ecology* 1-11
- Morin S, Coste M, Delmas F (2008) A comparison of specific growth rates of periphytic diatoms of varying cell size under laboratory and field conditions. *Hydrobiologia* 614 : 285-297
- Morin S, Duong TT, Herlory O, Feurtet-Mazel A, Coste M (2008) Cadmium toxicity and bioaccumulation in freshwater biofilms. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 54 : 173-186
- Morin S, Cordonier A, Lavoie I, Arini A, Blanco S, Duong TT, Tornés E, Bonet B, Corcoll N, Faggiano L, Lavail M, Pérès F, Becares E, Coste M, Feurtet-Mazel A, Fortin C, Guasch H, Sabater S (2012a) Consistency in diatom response to metal-contaminated environments. In *Emerging and priority pollutants in rivers*. Springer Berlin Heidelberg :117-146

- Morin S, Lambert AS, Artigas J, Coquery M and Pesce S (2012b) Diatom immigration drives biofilm recovery after chronic copper exposure. *Freshwater Biology* 57 : 1658-1666
- Morin S, Pesce S, Tlili A, Coste M, Montuelle B (2010) Recovery potential of periphytic communities in a river impacted by a vineyard watershed. *Ecological Indicators* 10 : 419-426
- Morris JM, Nimick DA, Farag AM, Meyer JS (2005) Does biofilm contribute to diel cycling of Zn in High Ore Creek, Montana?. *Biogeochemistry* 76 : 233-259
- Murdock JN, Dodds WK (2007) LINKING BENTHIC ALGAL BIOMASS TO STREAM SUBSTRATUM TOPOGRAPHY1. *Journal of Phycology* 43 : 449-460

N

- Nausch M, Pollehne F, Kerstan E (1998) Extracellular enzyme activities in relation to hydrodynamics in the Pomeranian Bight (Southern Baltic Sea). *Microbial ecology* 36 : 251-258
- Navarro E, Robinson CT, Behra R (2008) Increased tolerance to ultraviolet radiation (UVR) and cotolerance to cadmium in UVR-acclimatized freshwater periphyton. *Limnology and Oceanography* 53 : 1149-1158
- Necchi O (2004) Photosynthetic responses to temperature in tropical lotic macroalgae. *Phycological Research* 52 :140-148
- Neu TR, Lawrence JR (1997) Development and structure of microbial biofilms in river water studied by confocal laser scanning microscopy. *FEMS Microbiology Ecology* 24 : 11-25
- Nguyen-Deroche TLN (2008) Effets du cuivre et du zinc sur la photosynthèse et le métabolisme d'une cyanobactérie et de diatomées marines du littoral vietnamien; comparaison avec des espèces de la côte atlantique française (Doctoral dissertation, Le Mans)

- Nield J (1997) Structural characterization of Photosystem II (Doctoral dissertation, University of London, Imperial College)
- Nield J, Rizkallah PJ, Barber J, Chayen NE (2003) The 1.45 Å three-dimensional structure of C-phytyocyanin from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus elongatus*. *Journal of structural biology* 141 : 149-155
- Nielsen PH, Jahn A (1999) Extraction of EPS. In : Wingender J, Neu TR, Flemming HC, editors. *Microbial extracellular polymeric substances: characterization, structure and function*. Berlin Heidelberg : Springer Verlag : 49-72
- Nies DH (2003) Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS microbiology reviews* 27: 313-339
- Nies DH, Silver S (1995) Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. *Journal of industrial microbiology* 14 : 186-199
- Niklinska M, Chodak M, Laskowski R (2006) Pollution-induced community tolerance of microorganisms from forest soil organic layers polluted with Zn or Cu. *Applied Soil Ecology* 32 : 265-272
- Nimick DA, Gammons CH, Cleasby TE, Madison JP, Skaar D, Brick CM (2003) Diel cycles in dissolved metal concentrations in streams: occurrence and possible causes. *Water Resources Research* 39
- Noyes PD, McElwee MK, Miller HD, Clark BW, Van Tiem LA, Walcott KC, ... Levin ED (2009) The toxicology of climate change: environmental contaminants in a warming world. *Environment international* 35 : 971-986
- Nriagu JO (1979) *Copper in the environment. Part II. Health effects*. John Wiley and Sons, New York, N.Y.

O

- Oksanen J, Blanchet FG, Kindt R, Legendre P, Minchin PR, O'Hara RB, Simpson GL, Solymos P, Stevens MHH, Wagner H (2013) Package 'vegan'. *R Packag ver* 254 : 20-8

- Oraison F, Souchon Y, Van Looy K (2011) Restaurer l'hydromorphologie des cours d'eau et mieux maîtriser les nutriments: une voie commune ?. Pôle Hydroécologie des cours d'eau Onema-Irstea Lyon MAEP-LHQ : 42
- Orlowsky B, Seneviratne SI (2012) Global changes in extreme events : regional and seasonal dimension. *Climatic Change* 110 : 669-696
- Oukarroum A, Perreault F, Popovic R (2012) Interactive effects of temperature and copper on photosystem II photochemistry in *Chlorella vulgaris*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 110 : 9-14
- Owen RB, Renaut R, Jones B (2008) Geothermal diatoms : a comparative study of floras in hot spring systems of Iceland, New Zealand, and Kenya. *Hydrobiologia* 610 : 175-192
- Ozdemir G, Ozturk T, Ceyhan N, Isler R, Cosar T (2003) Heavy metal biosorption by biomass of *Ochrobactrum anthropi* producing exopolysaccharide in activated sludge. *Bioresource Technology* 90 : 71-74

P

- Paine RT, Tegner MJ, Johnson EA (1998) Compounded perturbations yield ecological surprises. *Ecosystems* 1 : 535-545
- Pekárová P, Miklánek P, Halmová D, Onderka M, Pekár J, Kučárová K, Liová S, Škoda P (2011) Long-term trend and multi-annual variability of water temperature in the pristine Bela River basin (Slovakia). *Journal of Hydrology* 400 : 333-340
- Perales-Vela HV, Peña-Castro JM, Canizares-Villanueva RO (2006) Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae. *Chemosphere* 64 : 1-10
- Pesce S, Batisson I, Bardot C, Fajon C, Portelli C, Montuelle B, Bohatier J (2009) Response of spring and summer riverine microbial communities following glyphosate exposure. *Ecotoxicology and environmental safety* 72 : 1905-1912
- Pesce S, Margoum C, Montuelle B (2010) In situ relationships between spatio-temporal variations in diuron concentrations and phototrophic periphyton tolerance in a contaminated river. *Water Research* 44 : 1941-1949

- Pesce S, Tlili A, Montuelle B (2008) Les biofilms aquatiques: dans quelle mesure permettent-ils de comprendre l'effet des pesticides sur le fonctionnement des cours d'eau? Exemple en zone de vignoble. *Ingénieries-EAT* (55-56), p-79
- Peterson CG, Stevenson RJ (1989) Substratum conditioning and diatom colonization in different current regimes. *Journal of Phycology* 25 : 790-793
- Phoenix VR, Holmes WM (2008) Magnetic resonance imaging of structure, diffusivity, and copper immobilization in a phototrophic biofilm. *Applied and environmental microbiology* 74 : 4934-4943
- Pinto E, Sigaud-kutner T, Leita MA, Okamoto OK, Morse D, Colepicolo P (2003) HEAVY METAL-INDUCED OXIDATIVE STRESS IN ALGAE1. *Journal of Phycology* 39 : 1008-1018
- Potapova M, Charles DF (2005) Choice of substrate in algae-based water-quality assessment. *Journal of the North American Benthological Society* 24 : 415-427
- Provenzano MR, El Bilali H, Simeone V, Baser N, Mondelli D, Cesari G (2010) Copper contents in grapes and wines from a Mediterranean organic vineyard. *Food Chemistry* 122 : 1338-1343
- Pusch M, Fiebig D, Brettar I, Eisenmann H, Ellis BK, Kaplan LA, Lock MA, Naegeli MW, Traunsperger W (1998) The role of micro-organisms in the ecological connectivity of running waters. *Freshwater Biology* 40 : 453-495

R

- Rabiet M, Margoum C, Gouy V, Carluier N, Coquery M (2008) Transfert des pesticides et métaux dans un petit bassin versant viticole—Étude préliminaire de l'influence des conditions hydrologiques sur le transport de ces contaminants. *Ingénierie EAT, Special issue «Azote, phosphore et pesticides: Stratégies et perspectives de réduction des Flux :* 65-75

- Rai LC, Gaur JP, Kumar HD (1981) PHYCOLOGY AND HEAVY-METAL POLLUTION. Biological reviews 56 : 99-151
- Ralph PJ, Burchett MD (1998) Photosynthetic response of *Halophila ovalis* to heavy metal stress. Environmental Pollution 103 : 91-101
- Ramade F (1998) Dictionnaire encyclopédique des sciences de l'eau
- Rand GM, Petrocelli SR (1985) Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications. FMC Corp., Princeton, NJ
- Rao DGVP, Khan MAQ (2000) Zebra mussels: Enhancement of copper toxicity by high temperature and its relationship with respiration and metabolism. Water Environment Research 72 : 175-178
- Rendueles O, Ghigo JM (2012) Multi-species biofilms: how to avoid unfriendly neighbors. FEMS microbiology reviews 36 : 972-989
- Rensing C, Fan B, Sharma R, Mitra B, Rosen BP (2000) CopA : an *Escherichia coli* Cu (I)-translocating P-type ATPase. Proceedings of the National Academy of Sciences 97 : 652-656
- Rensing C, Grass G (2003) *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. FEMS microbiology reviews 27 : 197-213
- Ricciardi F, Bonnineau C, Faggiano L, Geiszinger A, Guasch H, Lopez-Doval J, Muñoz I, Proia L, Ricart M, Sabater S (2009) Is chemical contamination linked to the diversity of biological communities in rivers? TrAC Trends in Analytical Chemistry 28 : 592-602
- Ricklefs, RE, Miller GL (2005) Ecologie. Edition De Boeck Supérieur. p 245
- Riedel GF, Sanders JG (2003) The interrelationships among trace element cycling, nutrient loading, and system complexity in estuaries: A mesocosm study. Estuaries 26 : 339-351
- Ritz C, Streibig JC (2005) Bioassay analysis using R. Journal of Statistical Software 12 : 1-22
- Roeselers G, Van Loosdrecht MCM, Muyzer G (2007) Heterotrophic pioneers facilitate phototrophic biofilm development. Microbial Ecology 54 : 578-585

- Romaní A M, Fund K, Artigas J, Schwartz T, Sabater S, Obst U (2008) Relevance of polymeric matrix enzymes during biofilm formation. *Microbial ecology* 56 : 427-436
- Roosa S, Wattiez R, Prygiel E, Lesven L, Billon G, Gillan DC (2014) Bacterial metal resistance genes and metal bioavailability in contaminated sediments. *Environmental Pollution* 189 : 143-151
- Rose FL, Cushing CE (1970) Periphyton: autoradiography of zinc-65 adsorption. *Science* 168 : 576-577
- Rotter S, Sans-Piché F, Streck G, Altenburger R, Schmitt-Jansen M (2011) Active bio-monitoring of contamination in aquatic systems—an in situ translocation experiment applying the PICT concept. *Aquatic Toxicology* 101 : 228-236
- Roussel H, Ten-Hage L, Joachim S, Le Cohu R, Gauthier L, Bonzom JM (2007) A long-term copper exposure on freshwater ecosystem using lotic mesocosms: primary producer community responses. *Aquatic Toxicology* 81 : 168-182
- Rouch DA, Lee BT, Morby AP (1995) Understanding cellular responses to toxic agents: a model for mechanism-choice in bacterial metal resistance. *Journal of industrial microbiology* 14 : 132-141
- Roux A, Ghigo JM (2006) Les biofilms bactériens. Consulté le 25 mai 2015 à partir de <http://documents.irevues.inist.fr/handle/2042/47842>
- R Development Core Team (2012) R : a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing: Vienna. Retrieved April 1, 2015 from <http://www.R-project.org>

S

- Sabater S, Guasch H, Ricart M, Romani A, Vidal G, Klunder C, Schmitt-Jansen M (2007) Monitoring the effect of chemicals on biological communities. The periphyton as an interface. *Analitical and Bioanalitical Chemistry* 387 : 1425-1434

- Sabater S, Guasch H, Romaní A, Muñoz I (2002) The effect of biological factors on the efficiency of river biofilms in improving water quality. *Hydrobiologia* 469 : 149-156
- Sabatini SE, Juárez ÁB, Eppis MR, Bianchi L, Luquet CM, de Molina MDCR (2009) Oxidative stress and antioxidant defenses in two green microalgae exposed to copper. *Ecotoxicology and environmental safety* 72 : 1200-1206
- Sanchez L, Conrod S, Gidrol X, Fekete A, Schmitt-Kopplin P, Heulin T, Achouak W (2007) Exploration of intraclonal adaptation mechanisms of *Pseudomonas brassicacearum* facing cadmium toxicity. *Environmental Microbiology* 9 : 2820-2835
- Sanders RW, Porter KG, Bennett SJ, DeBiase AE (1989) Seasonal patterns of bacterivory by flagellates, ciliates, rotifers, and cladocerans in a freshwater planktonic community. *Limnology and oceanography* 34 : 673-687
- Say PJ, Diaz BM, Whitton BA (1977) Influence of zinc on lotic plants. *Freshwater Biology* 7 : 357-376
- Scheinberg H (1991) Copper. – In : Merian, E. (ed.), *Metals and their compounds in the environment*. VCH, Weinheim, pp. 893-908
- Schelske C (1984) In situ and natural phytoplankton assemblage bioassays. *Algae as Ecological Indicators*, Academic Press, New York 1984 : 15-47, 6 fig, 106 ref.
- Schmitt-Jansen M, Altenburger R (2008) Community-level microalgal toxicity assessment by multiwavelength-excitation PAM fluorometry. *Aquatic Toxicology* 86 : 49-58
- Schmitt-Jansen M, Veit U, Dudel G, Altenburger R (2008) An ecological perspective in aquatic ecotoxicology: Approaches and challenges. *Basic and Applied Ecology* 9 : 337-345
- Schreiber U, Muller JF, Haugg A, Gademann R (2002) New type of dual-channel PAM chlorophyll fluorometer for highly sensitive water toxicity biotests. *Photosynthetic Research* 74 : 317-330
- Segner H (2007) Ecotoxicology–How to Assess the Impact of Toxicants in a Multi-Factorial Environment?. In *Multiple stressors: a challenge for the future*. Springer Netherlands : 39-56

- Sendra V (2007) Homéostasie et résistance au cuivre chez *Cupriavidus metallidurans* CH34 : la protéine CopH et les transporteurs membranaires CusA et CzcA (Doctoral dissertation, Université Joseph-Fourier-Grenoble I)
- Serra A, Corcoll N, Guasch H (2009) Copper accumulation and toxicity in fluvial periphyton : the influence of exposure history. *Chemosphere* 74 : 633-641
- Serra A, Guasch H (2009) Effects of chronic copper exposure on fluvial systems: Linking structural and physiological changes of fluvial biofilms with the in-stream copper retention. *Science of the Total Environment* 407 : 5274-5282
- Serra A, Guasch H, Admiraal W, Van der Geest HG, Van Beusekom SAM (2010) Influence of phosphorus on copper sensitivity of fluvial periphyton: the role of chemical, physiological and community-related factors. *Ecotoxicology* 19 : 770-780
- Sigg L, Xue H (1994) Metal speciation: concepts, analysis and effects. In: Bidoglio G, Stumm W (Eds.) *Chemistry of Aquatic Systems: Local and Global Perspectives*. ECSC, EEC, EAEC, Brussels: Luxembourg, pp. 153–181
- Singh J, Kalamdhad AS (2012) Concentration and speciation of heavy metals during water hyacinth composting. *Bioresource technology* 124 : 169-179
- Sinsabaugh RL, Findlay S, Franchini P, Fischer D (1997) Enzymatic analysis of riverine bacterioplankton production. *Limnology and Oceanography* 42 : 29-38
- Smith MD (2011) An ecological perspective on extreme climatic events: a synthetic definition and framework to guide future research. *Journal of Ecology* 99 : 656-663
- Soldo D, Behra R (2000) Long-term effects of copper on the structure of freshwater periphyton communities and their tolerance to copper, zinc, nickel and silver. *Aquatic toxicology* 47 : 181-189
- Staehr PA, Sand-Jensen KAJ (2006) Seasonal changes in temperature and nutrient control of photosynthesis, respiration and growth of natural phytoplankton communities. *Freshwater Biology* 51 : 249-262
- Stauber JL, Davies CM (2000) Use and limitations of microbial bioassays for assessing copper bioavailability in the aquatic environment. *Environmental Reviews* 8 : 255-301

- Stauber JL, Florence TM (1987) Mechanism of toxicity of ionic copper and copper complexes to algae. *Marine Biology* 94 : 511-519
- Steemann NE, Wium-Andersen S (1970) Copper ions as poison in the sea and in freshwater. *Marine Biology* 6 : 93–97
- Stevenson RJ (1996) An introduction to algal ecology in freshwater benthic habitats. In: *Algal Ecology - Freshwater Benthic Ecosystems* (Stevenson RJ, Bothwell ML, Lowe RL, Eds.) Academic Press, New York. pp.3-30
- Stevenson RJ (1983) Effects of current and conditions simulating autogenically changing microhabitats on benthic diatom immigration. *Ecology* 1514-1524
- Stevenson JR, Peterson CG (1991) Emigration and immigration can be important determinants of benthic diatom assemblages in streams. *Freshwater Biology* 26 : 279-294
- Stiff MJ (1971) Copper/bicarbonate equilibria in solutions of bicarbonate ion at concentrations similar to those found in natural water. *Water Research* 5 : 171-176
- Stokes PM (1983) Responses of freshwater algae to metals. *Progress in phycological research*
- Stumm W, Morgan JJ (1981) *Aquatic chemistry: an introduction emphasizing chemical equilibria in natural waters*. John Wiley
- Sunda WG, Huntsman SA (1998) Processes regulating cellular metal accumulation and physiological effects: phytoplankton as model systems. *Science of the Total Environment* 219 : 165-181

T

- Tercier-Waeber ML, Hezard T, Masson M, Schäfer J (2009) In situ monitoring of the diurnal cycling of dynamic metal species in a stream under contrasting photobenthic biofilm activity and hydrological conditions. *Environmental science and technology* 43 : 7237-7244

- Tercier Waeber ML, Stoll S, Slaveykova V (2012) Trace metal behavior in surface waters: emphasis on dynamic speciation, sorption processes and bioavailability. *Archives des Sciences* 65 : 119-142
- Tien CJ (2004) Some aspects of water quality in a polluted lowland river in relation to the intracellular chemical levels in planktonic and epilithic diatoms. *Water research* 38 : 1779-1790
- Tien CJ, Chen CS (2013) Patterns of metal accumulation by natural river periphyton during their growth and seasonal succession. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 64 : 605-616
- Tlili A, Berard A, Blanck H, Bouchez A, Cássio F, Eriksson KM, Morin S, Montuelle B, Navarro E, Pascoal C, Pesce S, Schmitt-Jansen M, Behra R (2015) Pollution-induced community tolerance (PICT) : towards an ecologically relevant risk assessment of chemicals in aquatic systems. *Freshwater Biol* DOI: 10.1111/fwb.12558
- Tlili A, Bérard A, Roulier JL, Volat B, Montuelle B (2010) PO 4 3– dependence of the tolerance of autotrophic and heterotrophic biofilm communities to copper and diuron. *Aquatic Toxicology* 98 : 165-177
- Tlili A, Corcoll N, Bonet B, Morin S, Montuelle B, Berard A, Guasch H (2011) In situ spatio-temporal changes in pollution-induced community tolerance to zinc in autotrophic and heterotrophic periphyton communities. *Ecotoxicology* 20 : 1823-1839
- Tlili A, Dorigo U, Montuelle B, Margoum C, Carluier N, Gouy V, Bouchez A, Bérard A (2008) Responses of chronically contaminated biofilms to short pulses of diuron: an experimental study simulating flooding events in a small river. *Aquatic Toxicology* 87 : 252-263
- Tlili A, Maréchal M, Bérard A, Volat B, Montuelle B (2011) Enhanced co-tolerance and co-sensitivity from long-term metal exposures of heterotrophic and autotrophic components of fluvial biofilms. *Science of the Total Environment* 409 : 4335-4343
- Tlili A, Marechal M, Montuelle B, Volat B, Dorigo U, Bérard A (2011) Use of the MicroResp™ method to assess pollution-induced community tolerance to metals for lotic biofilms. *Environmental Pollution* 159 : 18-24

- Tlili A, Montuelle B (2011) Microbial pollution-induced community tolerance. Tolerance to Environmental Contaminants. CRCpress : 85-108
- Tobar JL, Boubeta-Novas J, Arredondo-Vega BO, Fábregas J (1993) Incorporación de cobre en la microalga marina *Tetraselmis suecica* en función de su concentración en el medio. Actas III Congreso Latinoamericano de Ficología
- Tornés E, Cambra J, Goma J, Leira M, Ortiz R, Sabater S (2007, January) Indicator taxa of benthic diatom communities: a case study in Mediterranean streams. In *Annales de Limnologie-International Journal of Limnology*. EDP Sciences 43 :1-11
- Town RM, Filella M (2000) A comprehensive systematic compilation of complexation parameters reported for trace metals in natural waters. *Aquatic Sciences* 62 : 252-295

V

- Val J, Muñiz S, Gomà J, Navarro E (2015) Influence of global change-related impacts on the mercury toxicity of freshwater algal communities. *Science of The Total Environment*
- Van Sprang P, Vangheluwe M, Van Hyfte A, Heijerick D, Vandenbroele M, Verdonck F (2007) European union risk assessment report : Copper, copper (II) sulphate pentahydrate, copper (I) oxide, copper (II) oxide, dicopper chloride trihydroxide. Voluntary risk assessment, Environmental effects, (Part 1)
- Vidal M, Duarte CM, Agustí S, Gasol JM, Vaqué D (2003) Alkaline phosphatase activities in the central Atlantic Ocean indicate large areas with phosphorus deficiency. *Marine Ecology-Progress Series* 262 : 43-53
- Vinebrooke RD, Cottingham KL, Norberg J, Scheffer M, Dodson SI, Maberly SC, Sommer U (2004) Impacts of multiple stressors on biodiversity and ecosystem functioning: The role of species co-tolerance. *Oikos* 104 : 451-457
- Villeneuve A, Montuelle B, Bouchez A (2010) Influence of slight differences in environmental conditions (light, hydrodynamics) on the structure and function of periphyton. *Aquatic Sciences* 72 : 33-44

Vu B, Chen M, Crawford RJ, Ivanova EP (2009) Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules* 14 : 2535-2554

W

Wang WX, Dei RC (2001) Effects of major nutrient additions on metal uptake in phytoplankton. *Environmental Pollution* 111 : 233-240

Watnick P, Kolter R (2000) Biofilm, city of microbes. *Journal of bacteriology* 182 : 2675-2679

Weiss MS, Abele U, Weckesser J, Welte WU, Schiltz E, Schulz GE (1991) Molecular architecture and electrostatic properties of a bacterial porin. *Science* 254 : 1627-1630

Welsh PG, Lipton J, Chapman GA, Podrabsky TL (2000) Relative importance of calcium and magnesium in hardness-based modification of copper toxicity. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19 : 1624-1631

Wetzel RG (1979) The role of the littoral zone and detritus in lake metabolism. *Archiv für Hydrobiologie–Beiheft Ergebnisse* 13 : 145-161

Wilby RL (2008) Construting climate change scenarios of urban heat island intensity and air quality. *Environment and planning B, Planning & design* 35 : 902

Wilkinson KJ, Joz-Roland A, Buffle J (1997) Different roles of pedogenic fulvic acids and aquagenic biopolymers on colloid aggregation and stability in freshwaters. *Limnology and Oceanography* 42 : 1714-1724

Wingender J, Neu TR, Flemming HC (1999) What are bacterial extracellular polymeric substances? In *Microbial extracellular polymeric substances*. Springer Berlin Heidelberg : 1-19

Worms I, Simon DF, Hassler CS, Wilkinson KJ (2006) Bioavailability of trace metals to aquatic microorganisms: importance of chemical, biological and physical processes on biouptake. *Biochimie* 88 : 1721-1731

X

Xue HB, Sigg L (1990) Binding of Cu (II) to algae in a metal buffer. *Water Research* 24 : 1129-1136

Xue HB, Sigg L, Gächter R (2000) Transport of Cu, Zn and Cd in a small agricultural catchment. *Water Research* 34 : 2558-2568

Y

Yuan SJ, Sun M, Sheng GP, Li Y, Li WW, Yao RS, Yu HQ (2010) Identification of key constituents and structure of the extracellular polymeric substances excreted by *Bacillus megaterium* TF10 for their flocculation capacity. *Environmental science and technology* 45 : 1152-1157

Z

Zeng J, Wang WX (2011) Temperature and irradiance influences on cadmium and zinc uptake and toxicity in a freshwater cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*. *Journal of hazardous materials* 190 : 922-929

Zheng T, Hong H, Wang F, Maskaoui K, Su J, Tian Y (2002) The distribution characteristics of bacterial β -glucosidase activity in Taiwan strait. *Marine Pollution Bulletin* 45 : 168-176

Zobell CE (1943) The effect of solid surfaces upon bacterial activity. *Journal of bacteriology* 46 : 39

ANNEXES

Annexe 1

Mesure des concentrations en cuivre labile par DGT

Les concentrations en Cu « labile » (facilement dissociables, échangeables), correspondant à la forme libre du Cu (Cu^{2+}) et une partie des complexes dissous (de faible poids moléculaire) ont été mesurées à l'aide d'échantillonneurs passifs DGT « Diffusive Gradients in Thin film » - DGT (Fig. 1). Les DGT ont été placées dans les aquariums, dans l'axe du courant ; puis, après un certain temps d'exposition (typiquement 1 semaine), les DGT ont été retirées ; et une fois le Cu élué du dispositif, les concentrations ont été mesurées par ICP-MS, selon la norme NF EN ISO 17294-2, au laboratoire de chimie des milieux aquatiques (LAMA).



Figure A.1. *DGT après montage.*

La DGT est constituée d'une résine chélatrice échangeuse d'ions (Chelex-100), complexant fortement les ions métalliques présents dans le milieu environnant ; d'un gel diffusif, permettant le transport naturel d'espèces métalliques depuis le milieu vers la résine chélatrice ; ainsi que d'une membrane de protection. Le gel diffusif, la résine chélatrice et la membrane sont superposés sur un support en téflon et scellés par une bague, également en téflon (Fig A.2.).

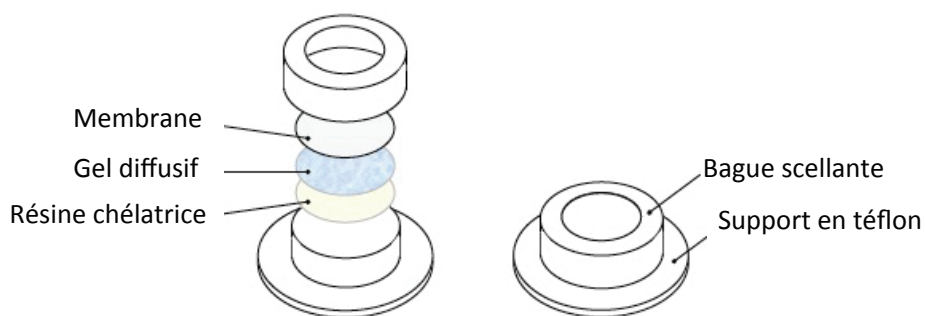


Figure A.2. Description d'un dispositif DGT démonté.

Le gel diffusif, dans une configuration classique, est composé d'un gel d'agarose contenant un polymère de polyacrylamide. Il permet la diffusion de l'ensemble des espèces dissoutes, non colloïdales, de manière similaire à leur diffusion dans l'eau (Zhang *et al.* 1999). La quantité de métal accumulée pendant l'exposition sur la résine est liée à la concentration en métal labile de la solution, selon l'équation suivante (Davisson et Zhang, 1994) :

Eq 1

$$C_{DGT} = \frac{M \times \Delta g}{t \times A \times D}$$

où :

- M est la quantité de métal accumulée sur la résine (ng)
- Δg représente l'épaisseur du gel diffusif (mm)
- t représente la durée d'exposition du dispositif dans la solution (s)
- A est la surface du gel en contact avec la solution (cm²)
- D est le coefficient de diffusion du métal dans le gel (10⁻⁶ cm² s⁻¹)

Expérimentalement, la quantité M de métal accumulé est évaluée après élution de la résine dans une solution d'acide nitrique (1 M). La concentration de l'éluat est dosée par absorption atomique et ramenée à la masse M selon l'équation suivante :

Eq 2

$$M = \frac{C_e \times (V_e + V_r)}{F_e}$$

où :

- C_e est la concentration en métal dans l'éluat (µg L⁻¹)
- V_e et V_r sont les volumes de l'éluat et de la résine (mL)
- F_e représente le rendement de l'élution (estimé à 80% par Zhang *et al.* (1995))

Annexe 2

Analyse de la réponse génétique du biofilm

1. Méthode d'analyse du niveau d'expression génétique

1.1. Extraction des ARNs totaux

Les suspensions de biofilm, obtenues après grattage dans un mélange équivalent d'eau minérale (Volvic, France) et d'eau déminéralisée, ont été centrifugées durant 15 min à 14000 g à température ambiante, afin d'éliminer l'eau. Afin d'éviter la dégradation des ARN, 300 µL de tampon RNA later ont été ajoutés aux culots de suspension de biofilm. Les échantillons ont été conservés à -80°C jusqu'à analyse.

Les échantillons ont été décongelés, puis centrifugés 30 sec à 8000 g, afin de culotter le biofilm. Le surnageant de RNA later a été éliminé et le culot a été remis en suspension dans un tube contenant 1 mL de Trizol et 300 µL de microbilles de verre (de 2,5 µm de diamètre) pour les diatomées et de silice (de 0,1 mm matrix B bulk) pour les bactéries. Les échantillons ont été passés au vortex (3 x 30 sec), afin de libérer le contenu cellulaire. Le surnageant a été récupéré et transféré dans un microtube propre, et enfin placé au bain marie 5 min à 37°C. Une solution de 200 µL de chloroforme a été ajoutée et une émulsion a été réalisée par vortex (10 sec). Le tout a été mis au bain marie 2 min à 37°C ; le but de cette étape étant d'éliminer la majorité des protéines présentes dans l'extrait. Les tubes ont été ensuite centrifugés 5 min à 8000 g (température ambiante) et la phase aqueuse contenant les acides nucléiques a été récupérée. La suite de l'extraction d'ARN a été réalisée à l'aide du kit « SV Total RNA Isolation System » suivant les recommandations du fournisseur données ci dessous :

- Récupérer la phase aqueuse (phase supérieure) (±600µl) dans un tube propre.
- Ajouter 450 µl ETOH 75%, préparée avec l'eau DEPC (*Favorise les liaisons ioniques*)
- Vortexer 5 sec
- Déposer sur colonne d'affinité (*Liaison ionique entre ADN, ARN et la colonne*)
- Centrifuger à 13500 rpm, 1', T°C ambiante (*ADN, ARN retenu sur colonne*). Jeter le filtrat
- Laver avec 600 µl de RNA Wash Solution
- Centrifuger à 13500 rpm, 1', T°C ambiante
Jeter le filtrat
- Centrifuger à 13500 rpm, 2', T°C ambiante (*sécher la colonne*)
- Préparer un mix enzyme contenant: 40 µl de Yellow Core Buffer + 5 µL de MnCl₂ + 5 µl DnaseI par échantillon
- Déposer 49 µl de mix sur chaque colonne

- Incuber à 37°C (Bain marie), minimum 15' (*dégradation ADN*)
- Ajouter 200 µl de Dnase Stop Solution
- Centrifuger à 13500 rpm, 1', à T°C ambiante (*Elimination des débris d'ADN et de Dnase*). Jeter les filtrats
- Ajouter 600 µl de RNA Wash Solution
- Centrifuger à 13500 rpm, 1', à T°C ambiante. Jeter le filtrat
- Ajouter 250 µL de RNA Wash Solution
- Centrifuger à 13500 rpm, 2', à T°C ambiante
- Déposer les colonnes d'affinité dans des tubes collecteurs
- Ajouter 30 µL d'eau Nucléase-Free
- Centrifuger à 13500 rpm, 1', à T°C ambiante
- Jeter la colonne, les ARN purifiés sont dans le fond du tube
- Stocker les ARN -80°C, jusqu'à analyse

Les ARNs totaux ainsi obtenus ont été transformés en ADNs complémentaires (ADNc) grâce à l'étape de rétrotranscription.

1.2. Rétrotranscription (RT)

Cette étape a permis de transformer les ARNs totaux en ADNs complémentaires (ADNc) à l'aide du kit « GoScript™ Reverse Transcription System ». Les concentrations en ARN mesurées par spectrophotométrie étant très faibles, nous sommes partis du principe que chaque échantillon contenait relativement la même concentration en ARN. Ainsi, la RT a été réalisée sur 10 µL d'ARN totaux extraits. A ces 10 µL d'ARN totaux extraits, ont été ajoutés:

- 1 µL d'oligo dT (1 µM),
- 1 µL d'hexaprimer (1 µM),

Les échantillons ont ensuite été placés dans un thermocycleur, afin de réaliser le premier cycle suivant: 5 min à 65°C, puis 5min à 4°C, permettant de linéariser l'ARN. A la suite de ce premier cycle, 8 µL de mix ont été ajoutés et contenaient:

- 1,5µl MgCl₂ (25 mM)
- 1µl PCR Nucleotide Mix
- 0,5µl Recombinant RNasin Ribonuclease inhibitor
- 1µl GoScript Reverse Transcriptase

Les échantillons ont été placés de nouveau dans le thermocycleur, afin de réaliser le second cycle suivant: 5 min à 25°C, puis 1 h à 42°C, afin de permettre la synthèse d'ADNc. Les ADNc ainsi obtenus ont été conservés à -20°C jusqu'à la réalisation de la PCR (Polymerase

Chain Reaction : amplification en chaîne par polymérase) quantitative en temps réel (Q-PCR, voir § 3.).

2. Gènes ciblés

2.1. Gènes de résistance au stress environnementale, impliqués dans le métabolisme cellulaire chez les diatomées

L'analyse de la réponse génétique des diatomées a été réalisée avec la collaboration de l'UMR EPOC (Université de Bordeaux 1- CNRS).

Six gènes d'intérêt, communs à toutes les espèces de diatomées, ont été étudiés (*act*, *psaA*, *d1*, *nad5*, *cox1*, *12s*). L'expression de ces gènes d'intérêt est induite par les organismes, en réponse à une exposition métallique et/ou à d'autres stress environnementaux (i.e. réponse génétique non spécifique au Cu).

Dans notre étude, la β -actine (*act*) a été utilisée comme gène de référence (la β -actine étant un « gène de ménage », il s'exprime par conséquent de la même manière, quelque soit le contexte d'exposition thermique et chimique). Les gènes *psaA* et *d1*, qui codent pour les complexes membranaires protéiques des chloroplastes (photosystèmes I et II), intervenant dans la photosynthèse (voir Chapitre I, §2.3.3.). Trois gènes, codant pour la sous-unité 1 de la cytochrome-c-oxydase (*cox1*), la sous-unité 5 de la NADH déshydrogénase (*nad5*) et l'ARN ribosomique 12S (*12S*), impliqués dans le métabolisme mitochondrial. Enfin, le gène *sodMn*, qui code pour la superoxide dismutase mitochondriale, intervenant contre le stress oxydant (Kim Tiam et al. (2012) ; Nguyen-Deroche, 2008 ; Moisset et al. 2015). La caractérisation des séquences nucléiques des 7 gènes d'intérêt, utilisées dans notre étude, est le résultat de recherches antérieures, réalisées par Kim Tiam et al. (2012), et Moisset et al. (2015). Les amorces, utilisées pour déterminer leur expression différentielle, sont présentées ci après :

Nom du gène	Amorces (5'-3')
<i>nad5</i>	CTAATCCTGTTGTGGAAGCAAA ^a TGCTATGGAAGGTCCTACTCC ^b
<i>sodMn</i>	GGTAGTAGGCGTGCTCCC ^a CCAGGACAACCCGCTC ^b
<i>cox1</i>	GTTTTTGGTTATTACCACCTTC ^a ATAGAAGCAGCACCTGAAAGA ^b
<i>12S</i>	CAATATCTACGCATTTACCGC ^a AGGATGCAAGTGTTATCCGGAT ^b
<i>psaA</i>	TAGTGGAACCAACCAGCAAATA ^a GGTCAAGAAATTTTAAATGGTGA ^b
<i>d1</i>	CAGCCATGTGGAATGGGTGC ^a TCTGCAGTATTCTTAGTATACC ^b
<i>act</i>	CGACAGGACGGCCTGGATGTT ^a CCAACCGCGAGCGCATGACG ^b

a : amorce sens. b : amorce antisens

2.2. Gènes de résistance au cuivre chez les bactéries

Concernant le compartiment bactérien, la résistance au Cu a été suivie par analyse de l'expression du gène *copA*, codant pour la synthèse de pompes ATPase capables d'extruder le Cu (Sendra, 2007). Dans notre étude, le gène *16S* codant pour la petite sous unité ribosomale a été utilisé comme gène de référence. Les amorces utilisées pour déterminer l'expression différentielle des gènes *copA* et *16S* sont présentées ci-après :

Nom du gène	Amorces (5'-3')
<i>copA</i>	ATGTGGAAC SARATGCGKATGA ^a AGYTT CAGGCCSGGAATACG ^b
<i>16S</i>	CCTACGGGAGGCAGCAG ^a ATTACCGCGGCTGCTGGCA ^b

a : amorce sens. b : amorce antisens

3. PCR quantitative en temps réel :Q-PCR

La Q-PCR permet de quantifier précisément le niveau d'expression des gènes, en temps réel, grâce à l'ajout d'un agent intercalant fluorescent : le SYBR green. La fluorescence détectée à 530 nm a été mesurée à la fin de chaque cycle et quantifiée, afin de déterminer la quantité d'ADNc initial. Les réactions de PCR, réalisées dans une microplaque de 96 puits, ont été réalisées à l'aide du kit « GoTaq® qPCR Master Mix ». Pour cela, un « mix amorce » pour chaque gène, contenant 1 µL d'amorce sens (100 µM) et 1 µL d'amorce anti-sens (100 µM), a été préalablement réalisé. Dans chaque puits, ont été ajoutés 17 µL de mix réactif 1X (tampon d'activité, *Taq* polymérase, MgCl₂, dNTP et SYBR green), 2 µL du mix amorce, précédemment réalisé, et 1 µL d'ADNc, transcrit lors de l'étape précédente. La microplaque est ensuite déposée dans un thermocycleur (MX3000P), afin de réaliser différents cycles permettant par la suite l'analyse de l'expression génétique.

Les cycles réalisés, concernant l'analyse de l'expression génétique des diatomées, étaient les suivants (Moisset *et al.* 2015) :

- 10 min à 95°C, afin d'activer la *Taq* polymérase
- 40 à 50 cycles de 30 sec à 95°C (dénaturation), puis 30 sec à 55°C (hybridation) et enfin 30 sec à 72°C (élongation).

Les cycles réalisés, concernant l'analyse de l'expression génétique des bactéries étaient les suivants (Roosa *et al.* 2014) :

- 10 min à 94°C (dénaturation initiale)
- 40 cycles à 15 sec à 95°C (dénaturation), puis 30 sec à 63°C (*copA*) ou à 60°C (*16S*) (hybridation) et enfin 30 sec à 72°C (élongation)

Le niveau d'expression de chaque gène a été déterminé par rapport à celui du gène de référence: le gène *act* pour les diatomées et le gène *16S* pour les bactéries. La différence des moments de sortie (ΔC_t) entre le gène de référence et le gène d'intérêt a été calculée selon la méthode décrite par Livak and Schmittgen (2001). L'expression différentielle ($2^{-\Delta C_t}$) a été ensuite calculée. Le rapport de cette dernière chez les groupes exposés et chez le groupe contrôle (non exposé au Cu) correspondant à la même température et au même temps

d'échantillonnage donne le facteur d'induction ou de répression du gène considéré. Les résultats sont exprimés en facteurs d'induction ou de répression, par rapport au contrôle. On considère une induction significative lorsque le facteur est supérieur ou égale à 2 et une répression significative lorsque le facteur est inférieure ou égale à 0,5.



Structural and functional recovery of microbial biofilms after a decrease in copper exposure: Influence of the presence of pristine communities

Anne-Sophie Lambert^a, Soizic Morin^b, Joan Artigas^a, Bernadette Volat^a, Marina Coquery^a, Marc Neyra^a, Stéphane Pesce^{a,*}

^a Irstea, UR MALY, 3 bis quai Chauveau - CP 220, F-69336 Lyon, France

^b Irstea, UR REBX, 50 avenue de Verdun, F-33612 Cestas Cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 September 2011

Received in revised form 5 December 2011

Accepted 6 December 2011

Keywords:

Bacteria
Diatoms
Immigration
Periphyton
Photosynthesis
PICT

ABSTRACT

The present study aimed at assessing the recovery of phototrophic and heterotrophic biofilm communities after a decrease in copper exposure. An original experiment was designed to evaluate the possible influence of non-exposed (*i.e.* pristine) communities (*e.g.* via immigration processes) in recovery dynamics. Laboratory channels were used to study the structural and functional changes in microbial communities after a 4-week Cu exposure period in the presence and absence of pristine biofilms. When pristine biofilms were present, phototrophic communities recovered within 6 weeks, both in terms of biomass, structure and photosynthetic activity. Recovery processes were also detected using the PICT approach. In contrast, in the absence of pristine communities, all of the Cu-induced changes recorded in the phototrophic communities remained throughout the recovery period.

Regardless of the presence or absence of pristine biofilms, the decrease in Cu exposure did not abolish Cu-induced changes in bacterial community structure, whereas functional recovery (based on beta-glucosidase activity) was complete in both recovery contexts.

These results revealed that microbial community response to a decrease in Cu exposure differs between phototrophic and heterotrophic communities. The presence of pristine communities greatly influences the structural and functional recovery of phototrophic communities, suggesting an important role of microbial immigration processes, but have far less influence on the recovery trajectory of heterotrophic communities.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The restoration of chemically contaminated aquatic ecosystems has become an important concern, especially through environmental policies such as the European Water Framework Directive (2000/60/EC), prompting growing interest in studying recovery trajectories and community resilience in aquatic environments (Depledge, 1999; Ivorra et al., 1999; Tolcach and Gómez, 2002; Dorigo et al., 2010a; Morin et al., 2010). In lotic ecosystems, periphytic biofilms assume key ecological functions such as primary production and nutrient cycling (Battin et al., 2003). These microbial assemblages are formed by phototrophic and heterotrophic communities, both of which are characterized by short generation times. This, together with the fact that they are the first to

interact with dissolved substances, makes biofilms a candidate “early warning system” for detecting the effects of chemicals on aquatic systems (Sabater et al., 2007). Despite an increasing number of studies on the impact of toxicants on biofilm microbial communities, knowledge on their recovery dynamics following a decrease in exposure levels remains scarce (*e.g.* Boivin et al., 2006; Dorigo et al., 2010a,b; Morin et al., 2010; Rotter et al., 2011).

Aquatic environments are highly affected by metal pollution, with copper (Cu) being one of the most commonly detected contaminants in surface waters (Bossuyt and Janssen, 2004; Serra and Guasch, 2009). Chronic exposure to Cu is known to result in structural and functional effects in autotrophic and heterotrophic biofilm microbial communities (Soldo and Behra, 2000; Boivin et al., 2006; Serra and Guasch, 2009). The resulting changes in microbial communities generally lead to an increase in community tolerance to Cu, in line with the pollution-induced community tolerance (PICT) concept introduced by Blanck et al. (1988). The principle of PICT is that chronic contact with a toxicant can result in changes at the community level due to various toxicant-induced effects. These include individual acclimation (physiological or genetic

* Corresponding author at: Irstea, UR MALY, 3 bis quai Chauveau - CP 220, F-69336 Lyon, France. Tel.: +33 472208795; fax: +33 478477875.

E-mail addresses: soizic.morin@irstea.fr (S. Morin), joan.artigas-alejo@irstea.fr (J. Artigas), bernadette.volat@irstea.fr (B. Volat), marina.coquery@irstea.fr (M. Coquery), marc.neyra@irstea.fr (M. Neyra), stephane.pesce@irstea.fr (S. Pesce).

adaptation) and loss of sensitive species. This increase in Cu tolerance following a chronic exposure was previously described in experimental studies considering phototrophic (Soldo and Behra, 2000; Tlili et al., 2010) and heterotrophic (Boivin et al., 2006; Tlili et al., 2010) activities as microbial endpoints. Several weeks after transferring biofilms from a Cu-polluted downstream site to a reference upstream site exhibiting lower Cu concentrations, Dorigo et al. (2010a) observed a low decrease in algal and bacterial community tolerance to Cu, suggesting a slow recovery curve for these communities. *In situ* translocation experiments applying the PICT concept to assess biofilm recovery were also recently performed for organic pesticides, confirming that PICT approaches can be a suitable tool for the study of microbial recovery processes following toxicant exposure (Dorigo et al., 2010b; Rotter et al., 2011).

In situ studies provide the most realistic assessment of field conditions, but translocation approaches have limitations hampering effective assessment of the recovery potential of microbial communities following a decrease in exposure to a contaminant or class of contaminants. These limitations mainly stem from the fact that the studied sites (before and after biofilm translocation) generally differ not only in terms of toxicant concentrations but also in terms of nutrient content or other environmental (e.g. light, water flow, etc.) properties that can strongly influence microbial dynamics. Moreover, recovery is an ecological process driven, at least partially, by immigration of new organisms (Morin et al., 2010). Immigration processes are probably facilitated in translocation studies, since the exposed biofilms are transplanted into river sections colonized by indigenous communities. Indeed, Stevenson and Peterson (1989, 1991) have shown that immigration processes are a major driver of the colonization and recovery dynamics of diatom communities. Therefore, the observed recovery trajectories which result from changes in exposure conditions after the translocation are also assisted by such immigration processes. However, it remains virtually impossible to discriminate in translocation studies between the effects of regrowth of remaining viable cells when pollution pressure decreases vs. re-colonization by new immigrants.

Given this background, the main purpose of the present study was to test the ability of natural microbial biofilm communities to recover after copper exposure in laboratory channels. An original experimental approach was designed to assess the influence of the presence of pristine communities on recovery dynamics. Given the structural and functional complexity inherent to microbial biofilms, we hypothesized that recovery trajectories could vary between phototrophic and heterotrophic communities. Accordingly, a combination of methods was applied to assess microbial response following a decrease in Cu exposure in terms of biomass (dry weight, chlorophyll *a* content), structure (algal classes), diversity (diatom taxonomic analysis, bacterial genetic diversity) and phototrophic and heterotrophic functions. In addition, we used a PICT approach to detect variations in copper tolerance in phototrophic and heterotrophic communities. We expected recovery to be made faster by the presence of pristine communities *via* microbial immigration processes.

2. Materials and methods

2.1. Experimental setup

The experiment was carried out in 4 indoor glass channels composed of three independent compartments ($l \times w \times d = 63 \text{ cm} \times 11 \text{ cm} \times 4 \text{ cm}$) used as pseudo-triplicates (independent compartments supplied with the same water). Channels were used in recirculating mode throughout the study: 50 L of water was recirculated from a glass aquarium through centrifugal pumps at a rate of about 1.2 L/min (Rena Flow 600).

High-pressure sodium lamps were used to obtain a constant light intensity of 3500 lux under a 13 h/11 h light/dark regime.

The study was conducted for 11 weeks, from January 25th to April 13th 2011 under laboratory ambient temperature conditions (about 21 °C, Table 1). During the first week, all the channels were filled with river water, and a suspension of natural biofilms (collected on stones) sampled in January 2011 at the upstream site of the Morcille River (Beaujolais, Eastern France, see Montuelle et al. (2010) for details) to allow biofilm settlement on artificial substrates (microscopic glass slides) previously placed at the bottom of each channel. Concentration of dissolved Cu in the river water was less than $0.9 \mu\text{g L}^{-1}$. Then, the channels were filled with drilled groundwater containing very low concentrations of Cu ($<0.3 \mu\text{g L}^{-1}$) and adjusted to the sampling site conductivity (i.e., $600 \mu\text{S cm}^{-1}$) and nutrient concentrations (i.e. about 4 mg Si L^{-1} , $5 \text{ mg NO}_3 \text{ L}^{-1}$, and $0.05 \text{ mg PO}_4 \text{ L}^{-1}$). Two channels (called “Control”) were used as control channels (without Cu addition) and two channels (called “Cu”) were supplemented with $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ to obtain a Cu concentration close to the highest concentrations recorded in the downstream section of the Morcille river (i.e. about $20 \mu\text{g Cu L}^{-1}$, Montuelle et al., 2010). During this period, water was renewed weekly to maintain a relatively constant exposure level and to avoid nutrient depletion. The 4-week exposure period was followed by a 6-week recovery period: two channels were respectively kept as “control” and “Cu” channels identical to those described above, while the two other channels (called “ExCu1” and “ExCu2”, respectively) were not supplemented with Cu anymore. The “ExCu1” channel was designed to mimic a translocation experiment in order to test the influence of the presence of pristine communities on recovery dynamics. Accordingly, this channel was composed of half non-exposed biofilms (taken from “control” channels) and half previously exposed biofilms (taken from “Cu” channels). In channel ExCu1, biological assessments were only conducted on biofilms previously exposed in Cu channels. The last channel (“ExCu2”) was only composed of previously exposed biofilms (taken from “Cu” channels) to assess their recovery potential following a decrease in copper exposure without the possibility of microbial immigration from unexposed communities. During this period, water was renewed every two weeks.

2.2. Water analysis

Throughout the entire study, the main physico-chemical parameters and total dissolved Cu concentrations were measured before and 2 h after each water renewal (“exposure” and “recovery” periods).

Temperature, pH, conductivity, dissolved oxygen, and the concentrations of total organic carbon (TOC), dissolved organic carbon (DOC) and the primary dissolved nutrients (NO_3 , NO_2 , NH_4 , PO_4 and SiO_2) were measured following French standard operating procedures. In order to measure total dissolved Cu concentrations, 30 mL of channel water was filtered ($0.45 \mu\text{m}$ polyvinylidene difluoride (PVDF), Whatman) and acidified with 0.5% of nitric acid (Suprapur, Merck) before being stored at 4 °C until analysis. Filtered samples were analyzed using inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS X Series II, Thermo Electron). Quality controls were routinely checked using a certified reference material (Environment Canada, TM 27-3, Lake Ontario natural water).

2.3. Analysis of copper in biofilms

Cu concentrations in biofilms were analyzed before each water renewal during the “recovery” period (weeks 0, 2, 4 and 6) as previously described by Tlili et al. (2010). Briefly, biofilm was scraped from two glass substrates per replicate and suspended in 50 mL of Ultra-pure water (Milli-Q). This suspension was divided into

Table 1
Physico-chemical characteristics (mean values of biweekly samples \pm standard deviation (s.d.)) of water in the 4 channels before and 2 h after each water renewal during the recovery period (weeks 0, 2, 4, and 6). DO, dissolved oxygen; TOC, total organic carbon; DOC, dissolved organic carbon.

	Initial conditions (after water renewal)	Conditions after 2 weeks (before water renewal)			
	All the channels ($n = 36$)	Control ($n = 9$)	ExCu1 ($n = 9$)	ExCu2 ($n = 9$)	Cu ($n = 9$)
pH	7.9 ± 0.1	8.0 ± 0.2	8.1 ± 0.2	8.0 ± 0.2	8.0 ± 0.2
Conductivity ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	129.4 ± 16.3	121.6 ± 22.8	114.7 ± 19.3	116.4 ± 18.6	117.5 ± 20.7
DO (mg L^{-1})	8.6 ± 0.5	7.1 ± 2.0	7.3 ± 2.1	7.7 ± 2.5	7.0 ± 2.7
Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	20.8 ± 0.5	21.3 ± 1.1	22.0 ± 1.0	21.6 ± 1.1	21.4 ± 7.0
TOC (mg L^{-1})	1.94 ± 0.45	7.83 ± 2.92	9.57 ± 3.68	8.17 ± 2.65	8.15 ± 2.55
DOC (mg L^{-1})	1.06 ± 0.36	6.42 ± 105	7.52 ± 4.29	5.48 ± 3.88	3.87 ± 7.98
NO_3 (mg L^{-1})	4.06 ± 0.48	<1	<1	<1	<1
NO_2 (mg L^{-1})	0.04 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.02	0.04 ± 0.02	0.05 ± 0.03
NH_4 (mg L^{-1})	<0.01	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.02	0.02 ± 0.07
PO_4 (mg L^{-1})	0.04 ± 0.02	0.08 ± 0.05	0.10 ± 0.02	0.10 ± 0.03	0.07 ± 0.07
SiO_2 (mg L^{-1})	4.22 ± 179	1.27 ± 125	5.03 ± 0.85	9.50 ± 0.56	10.30 ± 7.27

two fractions of 20 mL, which were treated or not with 320 μL of EDTA (0.25 M) to quantify internalized Cu and total in-biofilm Cu, respectively. The biofilm suspensions were filtered (0.45 μm , PVDF, Millipore) and dried for 48 h at 50 $^{\circ}\text{C}$. Dried samples were digested with 3 mL of concentrated nitric acid (Suprapur, Merck), and Ultra-pure water (Milli-Q, Millipore) was added to dilute the acid concentrate. Finally, Cu analysis was performed as described above. Quality controls were routinely done using a certified reference material (IRMM, BCR 414, plankton).

2.4. Biofilm characterization

Phototrophic and heterotrophic communities were characterized every two weeks during the “recovery” period (weeks 0, 2, 4, and 6). Biofilms were carefully removed from slides using a razor blade, then suspended in mineral water (Volvic, France) before all analysis described below. Biofilm dry weight (DW) and ash-free dry mass (AFDM) were determined as described in Morin et al. (2010).

Phototrophic communities: Total chlorophyll *a* (chl *a*) and proportion of diatoms, chlorophyceae and cyanobacteria were determined by a multi-wavelength pulse amplitude-modulated (PAM) fluorometer on a Phyto-PAM system (H. Walz) as described in Schmitt-Jansen and Altenburger (2008). Photosynthetic efficiency was also estimated with the Phyto-PAM fluorometer using the saturation pulse method to determine PSII quantum yield (Schmitt-Jansen and Altenburger, 2008). Diatom sample preparation and taxonomic identification were performed following European standard NF EN 13946. About 400 frustules were counted per slide at 1000 \times magnification, and diatoms were identified to the lowest taxonomic level possible using standard references (Krammer and Lange-Bertalot, 1986–1991) and recent nomenclature updates.

Heterotrophic communities: Bacterial community structure was analyzed using automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA) following Tlili et al. (2011) with slight modifications. Briefly, biofilm DNA was extracted using the FAST DNA kit (QBIgene) according to the manufacturer's instructions. The 16S–23S bacterial intergenic spacer region was amplified using the primers S-D-Bact-1522-b-S-20 (eubacterial rRNA small subunit, 50-TGCGGCTGGATCCCTCCTT-30) and L-DBact-132-a-A-18 (eubacterial rRNA large subunit, 50-CCGGGTTTCCCATTCGG-30) (Ranjard et al., 2001) as described by Tlili et al. (2011). ARISA analyses were performed using an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technology) following the manufacturer's instructions, and ARISA profiles were analyzed using GelCompar II software (Applied Math NV) to output a matrix based on the quantification of relative band intensities. The extracellular enzymes leucine-aminopeptidase (LAP) and β -glucosidase (β -Glu) were

measured using the fluorescent-linked substrates aminomethyl-coumarin (AMC) and methylumbelliferyl (MUF), respectively (Sigma–Aldrich), according to Romani et al. (2004). Each biofilm suspension (0.7 mL) was incubated with 2 mL of the specific artificial substrate for each enzyme, at the previously determined saturating concentration. After 1 h 15 min incubation in the dark in a shaker, glycine buffer (pH 10.4, 0.3 mL to each sample) was added to stop the enzyme reaction and reach maximum AMC and MUF fluorescence, which was measured on a Biotek synergy HT fluorometer at 360/460 nm excitation/emission.

2.5. Short-term bioassays and tolerance assessment

Phototrophic and heterotrophic biofilm community tolerances to Cu were assessed using chlorophyll fluorescence and extracellular enzymatic activities (LAP and β -Glu) as endpoints (Tlili et al., 2010). A semi-logarithmic series of Cu concentrations was freshly prepared in sterile filtered Milli-Q water to obtain Cu concentrations ranging from 0.127 to 1270 mg L^{-1} . For bioassays based on chlorophyll fluorescence (phototrophic communities), biofilm suspensions (2.7 mL) were exposed to increasing concentrations of Cu (0.3 mL) for 2 h 30 min in a climatic chamber (MLR-350 Versatile Environmental Test Chamber, Sanyo) at a constant 21 $^{\circ}\text{C}$ under artificial light (1400 lux). Samples were kept for 30 min in a dark chamber, and then chlorophyll fluorescence (F0) was determined on a Phyto-PAM fluorometer. For bioassays based on LAP and β -Glu extracellular enzymatic activities (heterotrophic communities), biofilm suspensions (0.7 mL) were exposed to increasing concentrations of Cu (0.3 mL) for 4 h (in the dark, at 20 $^{\circ}\text{C}$, under gentle shaking) before being incubated with the two specific artificial substrates and analyzed as described above.

For all of the bioassays and for each sample triplicate, we ran four blanks and three analytical replicates with each of the nine increasing concentrations of Cu. PSII yield values observed for “analytical blanks” in PICT assessment with phototrophic communities (data not shown) were similar to those directly measured after sampling in the channels revealing that incubation in the climatic chamber had no effect on the physiological status of phototrophic communities. For each sample triplicate, EC_{50} value was calculated by performing a nonlinear regression on Hill's model using REGTOX software (version EV7.0.5., E. Vindimian, <http://eric.vindimian.9online.fr/>) integrating the optimal EC_{50} value (as determined by the model). EC_{50} values obtained for phototrophic (chl fluorescence) and heterotrophic (LAP and β -Glu activities) parameters were normalized to chl *a* contents (Soldo and Behra, 2000) and to AFDM, respectively.

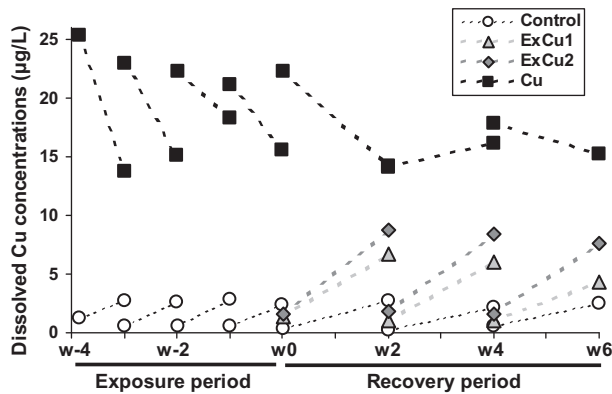


Fig. 1. Mean dissolved Cu concentrations ($\mu\text{g L}^{-1}$) measured in each channel during the exposure and recovery periods. Dotted lines indicate the time-course of concentrations between each water renewal.

2.6. Data processing

All between-treatment comparisons (biofilm characteristics and EC_{50} values) were performed using two-way ANOVA with repeated measures followed by a Tukey's post hoc test ($p < 0.05$) using the Microsoft Excel add-in program xlstat-ada (version 2009.4.02, <http://www.xlstat.com/>). All data were log-transformed prior to ANOVA analyses to ensure normality of data and homogeneity of variances.

Structural data, including diatom taxonomic analysis and bacterial ARISA profiles, were compared by non-metric multidimensional scaling (NMDS) using the matrix obtained from relative abundance analysis. Comparison of diatom communities was done by considering only the species representing more than 1% relative abundance in at least one sample. NMDS was performed using the labdsv package (<http://ecology.msu.montana.edu/labdsv/R/labdsv>) for the R statistical environment (Ihaka and Gentleman, 1996).

3. Results

3.1. Physico-chemical data

Table 1 reports the mean values of the main physical and chemical variables measured in the four channels during the 6-week recovery period. Temperature, pH, conductivity, and concentrations of dissolved oxygen, NH_4 , NO_2 and PO_4 remained relatively stable between each water renewal, whereas the concentrations of organic carbon (TOC and DOC) and NO_3 , statistically increased and decreased, respectively, in all channels ($p < 0.05$). Statistical analysis revealed no significant differences between the four channels for these physico-chemical parameters. The only statistical differences found between the channels at two weeks after each water renewal concerned silica (SiO_2) concentrations, which were significantly lower in the control and ExCu1 channels than in the Cu and ExCu2 channels ($p < 0.05$). Except for ExCu1, SiO_2 concentrations measured before each water renewal statistically differed from initial conditions ($p > 0.05$), revealing a notable uptake (Controls) or release (ExCu2 and Cu channels) of this compound.

3.2. Copper concentrations

In control channels, dissolved Cu concentrations remained under $3 \mu\text{g L}^{-1}$ throughout the study (Fig. 1), while total Cu in biofilms decreased from about 44 to $25 \mu\text{g Cu g}^{-1}$ DW during the recovery period (Fig. 2A), with a high percentage of internalized Cu (75–88%). In Cu channels, dissolved Cu concentrations ranged

from 14 to $25 \mu\text{g L}^{-1}$, and decreased notably between most water renewals (Fig. 2). During the recovery period, total Cu was 30- to 55-fold higher in exposed biofilms (1200 – $1450 \mu\text{g Cu g}^{-1}$; Fig. 2D) than in control channels, while the proportion of intracellular content increased progressively from week 0 (27%) to week 6 (57%).

In the ExCu1 and ExCu2 channels, dissolved Cu concentrations increased from about $1.1 (\pm 0.2)$ to $5.7 (\pm 1.2) \mu\text{g L}^{-1}$ and from about $1.6 (\pm 0.1)$ to $8.3 (\pm 0.6) \mu\text{g L}^{-1}$, respectively, between each water renewal during the recovery period (Fig. 1). In parallel, total Cu concentrations in biofilms decreased sharply from week 0 to week 6. This decrease, which was more pronounced in ExCu1 (about $233 \mu\text{g Cu g}^{-1}$ at week 6; Fig. 2) than in ExCu2 (about $475 \mu\text{g Cu g}^{-1}$ at week 6; Fig. 2), was mainly attributable to a decrease in extracellular Cu content, which fell about 20- and 5-fold in ExCu1 and ExCu2, respectively, over the course of the recovery period.

3.3. Structural characteristics of biofilms

3.3.1. Total and algal biomass

During the entire recovery period, AFDM (Fig. 3) represented more than 80% of total biofilm biomass (DW, data not shown) in all the channels. AFDM (Fig. 3) and chl *a* concentrations (Fig. 3) were always significantly lower in Cu channels than in controls. From week 2 to week 6, there were no statistical differences in AFDM concentrations between ExCu channels (ExCu 1 and ExCu2) and Cu channels (Fig. 3). Chl *a* concentrations (Fig. 3B) in ExCu2 were also similar to those measured in Cu until the end of the recovery period. In contrast, chl *a* concentrations increased in ExCu1 from week 4, reaching a similar level to that recorded in controls at the last sampling time (week 6).

3.3.2. Algal class composition and diatom community structure

Algal class composition in Control and Cu channels remained relatively stable throughout the recovery period, with a marked difference between control communities, which were only composed of diatoms ($88 \pm 2\%$) and cyanobacteria ($12 \pm 2\%$), and Cu communities, which exhibited similar percentages of cyanobacteria ($12 \pm 1\%$) but lower percentages of diatoms ($36 \pm 5\%$) together with a high proportion of green algae ($52 \pm 4\%$).

In ExCu1 channels, there was a clear shift in algal class composition during the recovery period, and phototrophic communities showed similar profiles to those observed in controls at weeks 4 and 6. Algal community structure also evolved in ExCu2, with a slight decrease and increase in the proportion of green algae and diatoms, respectively. Nevertheless, changes were less pronounced than in ExCu1, and the percentage of green algae remained high in ExCu2 at the end of the recovery period ($39 \pm 3\%$).

The comparison of diatom assemblages using NMDS (Fig. 4A) allowed to clearly discriminate control and Cu communities throughout the 6-week recovery period. ExCu1 diatom communities were very similar to those observed in controls throughout the recovery period, whereas ExCu2 diatom communities also changed in structure but remained clearly different to Control communities until the end of the study.

3.3.3. Bacterial community structure

Analysis of bacterial community structure (assessed by PCR-ARISA) revealed a marked distinction between Control and Cu communities, as shown by NMDS (Fig. 4B). These two communities were mainly separated along the first axis. In the Control channels, the bacterial community evolved progressively over the 6-week recovery period (along the second axis), whereas the Cu community remained relatively stable until the end of the study.

Bacterial community structure in ExCu1 and ExCu2 channels exhibited more pronounced temporal trends than in Cu channels,

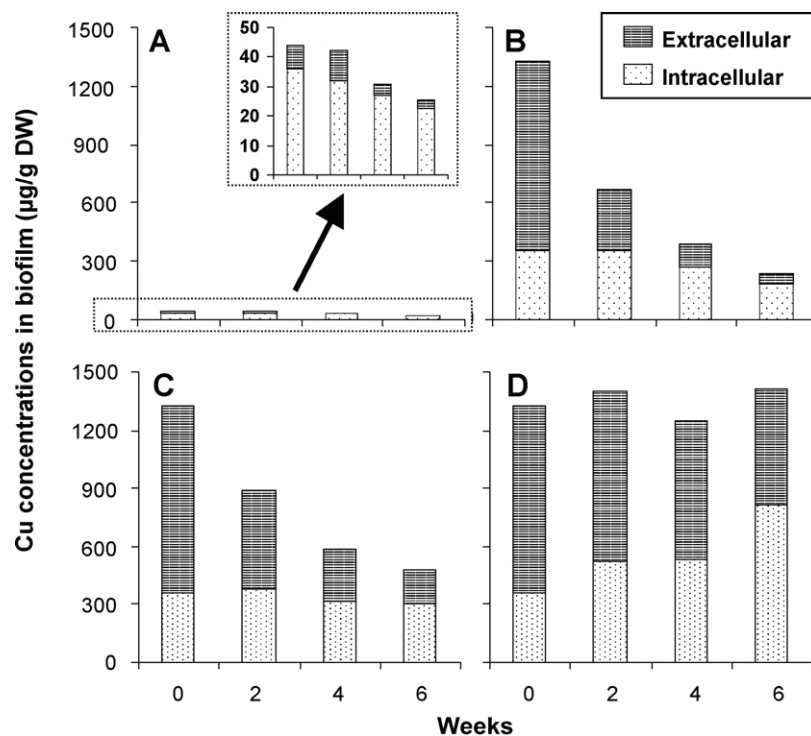


Fig. 2. Mean concentrations of extracellular and intracellular Cu ($\mu\text{g g}^{-1}$ dry weight of biofilm) during the 6-week recovery period in the Control (A), ExCu1 (B), ExCu2 (C) and Cu (D) channels.

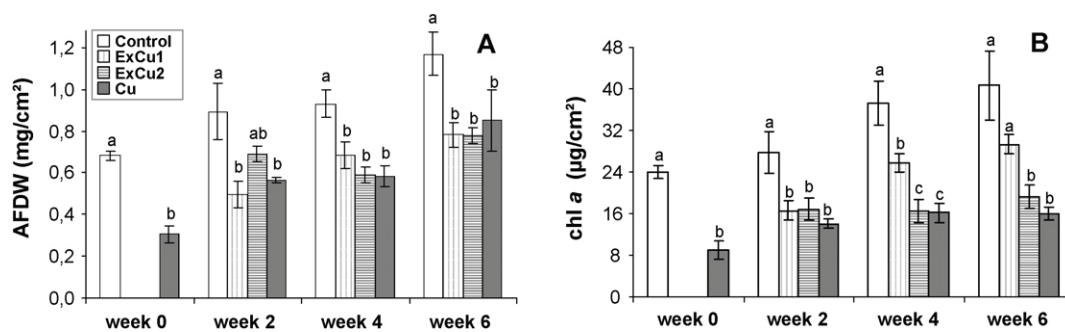


Fig. 3. Mean concentrations (\pm s.d.) of biofilm ash-free dry mass (AFDM, mg cm^{-2} , A) and chlorophyll *a* (chl *a*, $\mu\text{g cm}^{-2}$, B) during the 6-week recovery period. Different letters (a, b, c) indicate significant difference between channels at each sampling time (ANOVA, $p < 0.05$, $n = 3$).

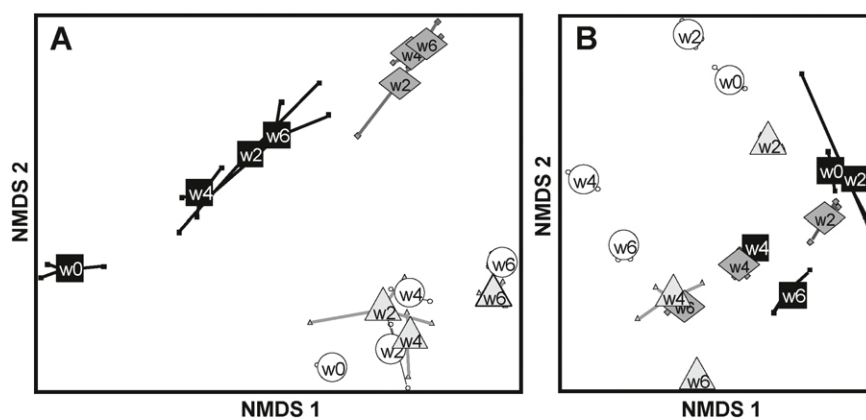


Fig. 4. Two-dimensional plot of the non-metric multidimensional analysis using diatom (microscopic taxonomic identification, A) and bacterial (PCR-ARISA analysis, B) community composition in the different channels during the 6-week recovery period (week 0 to week 6). Large symbols represent the centre of gravity of Control (○), ExCu1 (▲), ExCu2 (◆) and Cu (■) replicates, and lines show measures of dispersion ($n = 3$), at each sampling time (week (w) 0–6).

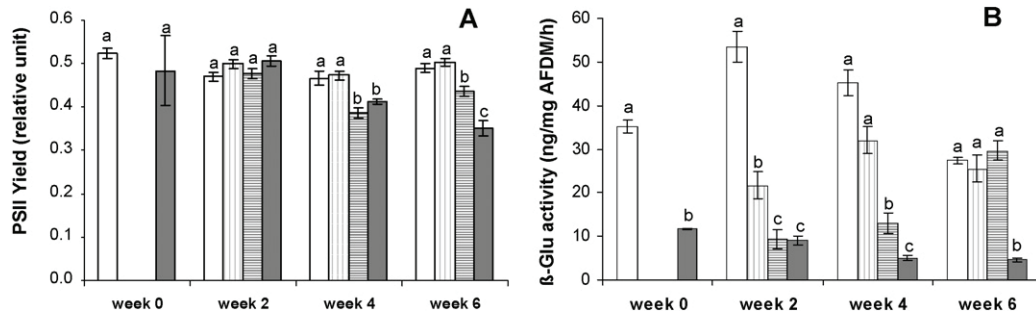


Fig. 5. Mean (\pm s.d.) photosynthetic efficiency (PSII yield, A) and β -glucosidase activity (β -Glu, ng mg^{-1} AFDM h^{-1} , B) during the 6-week recovery period. See Fig. 3 for symbol legends.

but was still quite distinct from controls at the end of the recovery period.

3.4. Functional characteristics of biofilms

3.4.1. Photosynthetic efficiency

Photosynthetic efficiency (Fig. 5A) measured in the Control channels remained relatively stable during the entire recovery period, without significant difference with Cu channels at the end of the 4-week exposure period (week 0) and during the first two weeks of the recovery period. However, photosynthetic efficiency decreased in Cu channels at weeks 4 and 6 and became significantly lower than the photosynthetic efficiency obtained in controls. A similar decrease was recorded in ExCu2 during the last two weeks, whereas Control and ExCu1 channels did not differ significantly at any point in the study.

3.4.2. Extracellular enzymatic activities

No statistical trend was found between the different channels for LAP activity during the entire recovery period, suggesting a lack of chronic effect of copper on this heterotrophic parameter (data not shown). In contrast, β -Glu activity levels recorded in control channels during the recovery period were always significantly higher than those measured in Cu channels (Fig. 5B). There was a significant increase in β -Glu activity in ExCu channels, which exhibited no statistical difference with controls after 4 weeks (ExCu1) or 6 weeks (ExCu2) of recovery.

3.5. Biofilm tolerance to copper

3.5.1. Phototrophic communities

EC_{50} determined from short-term toxicity tests based on chlorophyll fluorescence were higher in Cu channels than in controls throughout the recovery period (Fig. 6). This difference was statistically significant ($p < 0.05$), except at week 2 where we found high variability between Cu replicates. After 6 weeks of recovery, the ExCu1 community exhibited the same tolerance level to Cu ($\text{EC}_{50} = 0.09 \pm 0.03 \text{ mg Cu L}^{-1}$) as the Control community, whereas the ExCu2 community was about 4-fold more tolerant ($\text{EC}_{50} = 0.34 \pm 0.04 \text{ mg Cu L}^{-1}$), without significant difference with Cu channels.

3.5.2. Heterotrophic communities

Short-term toxicity tests performed using β -Glu activity to assess heterotrophic biofilm community tolerance to Cu revealed no effect of the toxicant (in our experimental conditions) on this parameter (data not shown). Accordingly, no EC_{50} values were determined.

Concentration–response curves were obtained for LAP activities, and the EC_{50} values obtained (normalized by mg of AFDM) were in the range $0.7\text{--}3.1 \text{ mg Cu L}^{-1}$ (data not shown). The

only statistical difference between Control and Cu communities was observed at the end of the 4-week exposure period (week 0), where Cu communities exhibited a 2-fold higher tolerance level ($\text{EC}_{50} = 2.1 \pm 0.5 \text{ mg Cu L}^{-1}$) than Control communities ($\text{EC}_{50} = 0.9 \pm 0.2 \text{ mg Cu L}^{-1}$). At the other sampling dates, no clear statistical trend was found between the different channels up to the end of the recovery period.

4. Discussion

4.1. Changes in Cu exposure conditions during the recovery period

After a 4-week period of exposure to high concentrations of Cu ($14\text{--}25 \mu\text{g L}^{-1}$), which are in the range of those previously measured in the downstream section of the Morcille River during peak contamination periods (Montuelle et al., 2010), we evaluated the ability of microbial biofilm communities to recover within 6 weeks. Two recovery dynamics scenarios were tested, i.e. biofilms only exposed to a decrease in Cu concentrations (ExCu2) vs. biofilms in contact with pristine communities (ExCu1). In both cases, dissolved Cu concentrations fluctuated between 1 and $9 \mu\text{g L}^{-1}$ during the entire recovery period, confirming that communities were exposed to a significant decrease in Cu exposure, even if dissolved Cu concentrations in ExCu channels were always higher than those recorded in controls. Copper concentrations in biofilms also decreased significantly, leading to a release of Cu in water as shown by the increase in dissolved Cu concentrations between each water renewal together with biomass accrual. Boivin et al. (2006) observed similar Cu partitioning and exchange between water and biofilms in another recovery study. In our work, most of the release was due to a decrease in the external fraction of Cu, which is more

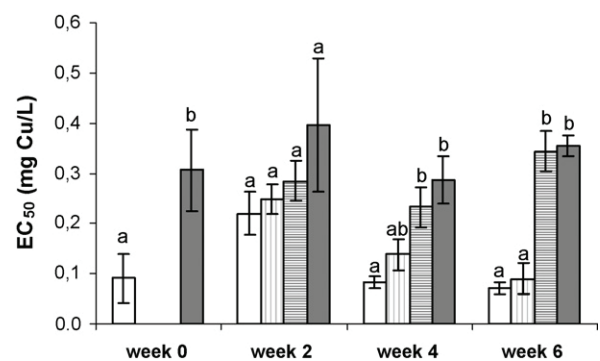


Fig. 6. Mean (\pm s.d.) EC_{50} values (mg Cu L^{-1}) determined after normalization per mg of chlorophyll *a* for phototrophic communities (based on chlorophyll fluorescence) during the 6-week recovery period. See Fig. 3 for symbol legends.

easily desorbable than the fraction that is sequestered intracellularly. Consequently, despite a marked decrease in extracellular Cu concentrations, intracellular Cu concentrations in the ExCu2 biofilm remained fairly constant (around $300 \mu\text{g g}^{-1}$) until the end of the recovery period. The presence of pristine biofilms in the ExCu1 channel favoured the decrease in Cu concentrations, both in the water phase and in the previously exposed biofilm. This may be explained by the fact that part of the released Cu was probably accumulated in the pristine biofilms. Dissolved Cu concentrations were thus always lower in ExCu1 than in ExCu2, and Cu exchanges between the water phase and the biofilm were consequently stimulated in ExCu1. At the end of the recovery period, both total and intracellular Cu concentrations were about 2-fold lower in the biofilms mixed with pristine communities than in the biofilms only exposed to a decrease in dissolved Cu concentrations. This reveals that the presence of non-previously exposed biofilms influenced Cu dissipation kinetics during the recovery period. The difference between the two recovery contexts (ExCu1 vs. ExCu2) was probably favoured by our experimental setup, especially by the fact that the channels were used in a recirculating mode and that water was only renewed every two weeks (thus limiting dissipation kinetics). Boivin et al. (2006) also recorded high Cu concentrations after 28 days of recovery in biofilms previously exposed to Cu, despite weekly water change. Dissipation would probably have been faster in an open experimental system or in a non-polluted river section, but a translocation experiment by Dorigo et al. (2010a) showed that a 9-week recovery period was not sufficient for complete biofilm Cu removal.

4.2. Recovery of phototrophic communities

As previously shown, the 4-week Cu exposure strongly reduced total and algal biomass (Barranguet et al., 2003; Guasch et al., 2004; Serra and Guasch, 2009) and triggered a marked shift in the algal community structure (Soldo and Behra, 2000; Guasch et al., 2002; Roussel et al., 2007; Serra and Guasch, 2009; Tlili et al., 2010). It led to a significant increase in green algae fraction and a decrease in diatom fraction, while no change was observed in the proportion of cyanobacteria. Silica concentrations between each water renewal strongly decreased in Control channels, reflecting the high consumption by diatoms (whose biomass was higher) without toxic pressure, whereas Cu provoked delayed growth of this algal group.

Regardless of the presence or absence of pristine biofilms, total biomass (DW and AFDM) showed no recovery within 6 weeks. Similarly, the decrease in Cu exposure was not sufficient to allow the recovery of algal biomass, except when previously exposed communities were mixed with pristine communities. In the presence of pristine communities, recovery was mainly due to a marked increase of diatoms, which after 4 weeks of recovery reached proportions close to those observed in controls whereas green algae had almost completely disappeared. In the absence of pristine communities, changes in the algal community structure following the decrease in Cu exposure remained limited, and despite a slight increase in the relative abundance of diatoms, green algae remained well represented at the end of the recovery period. This study suggests that diatom immigration probably plays an important role in the recovery of phototrophic communities, as previously suggested by Morin et al. (2010). This hypothesis was strengthened by diatom taxonomic analysis, which revealed that the evolution of diatom assemblages after the decrease in Cu exposure clearly differed depending on whether or not pristine communities were present. Based on diatom community structure, recovery was more pronounced when species immigration processes were possible, as previously observed in various *in situ* translocation experiments from toxicant-polluted to pristine sites (Ivorra et al., 1999; Morin et al., 2010; Rotter et al., 2011).

In line with the PICT concept and as previously reported by Soldo and Behra (2000) and Tlili et al. (2010), the structural changes that occurred in phototrophic communities chronically exposed to Cu led to an increase in Cu tolerance. However, the level of phototrophic biofilm community tolerance to toxicants depends not only on previous chronic exposure to the toxicant but also on other environmental parameters, such as phosphate content in the water (Guasch et al., 2004; Serra et al., 2010; Tlili et al., 2010) or light exposure history (Guasch and Sabater, 1998; Laviale et al., 2010). In our study, the between-channel difference in Cu tolerance cannot be explained by variation in physicochemical characteristics (PO_4 concentrations, conductivity, light, etc.), since we found no statistical differences in these parameters between the different channels. After the decrease in the exposure level, the presence of pristine biofilms greatly influenced the evolution of the tolerance capacity of phototrophic communities. At the end of the 6-week recovery period, biofilms mixed with pristine communities had lost the tolerance that had been induced during the exposure period. This recovery process was faster than the recovery described by Dorigo et al. (2010a), who observed that a 7-week recovery period after an *in situ* translocation was not sufficient to allow the total loss of tolerance of phototrophic communities previously exposed to Cu, despite the proximity of non-exposed biofilms. Conversely, in our study, tolerance levels remained constant in the communities that were never mixed with pristine communities, thus revealing the lack of recovery. This difference in tolerance capacities between the two kinds of biofilms after a decrease in Cu exposure can possibly be explained by the immigration of more sensitive species from pristine biofilms. Nevertheless, based on our results, it cannot be excluded that the difference in both water and biofilm Cu concentrations between the two recovery contexts may have led to a significant difference in Cu exposure, thus conditioning the changes in Cu tolerance levels.

Based on the measures of the photosynthetic efficiency, functional effects of chronic Cu exposure on phototrophic communities were only detected during the last two weeks of the study (*i.e.* after an 8-week exposure). Serra and Guasch (2009) also reported no effect of a 6-week Cu chronic exposure ($30 \mu\text{g L}^{-1}$) on this parameter, revealing that structural changes are more prominent than physiological damage, as previously shown by Guasch et al. (2002). However, the effects of Cu on photosynthesis efficiency can vary across studies. Guasch et al. (2004) found that biofilm photosynthetic efficiency was significantly inhibited by a 6-day Cu exposure ($15 \mu\text{g L}^{-1}$) whatever the nutrient level, whereas Tlili et al. (2010) showed that the simultaneous addition of Cu and nutrients may compensate for the inhibitory effect on physiological community response. Copper may exert its toxicity by interfering with photosynthesis in the chloroplasts and ATP production (Cid et al., 1995). Photosynthesis inhibition by copper has been observed previously in various diatom species, but concentration that affects photosynthesis depends on the species assayed but diatom growth is generally more affected by copper than photosynthesis (Cid et al., 1995). This uncoupling between division rate and photosynthesis can be due to copper inhibiting the process of cell division independently of any effect on the production of new cell material (Stauber and Florence, 1987). Here, the continuous decrease in photosynthetic efficiency observed during the four last weeks (-30%) suggests that even if communities developed tolerance processes under chronic exposure, they were unable to maintain their photosynthetic activity throughout the study. A similar decrease in photosynthetic efficiency was also recorded during the last two weeks in biofilms exposed to a decrease in Cu exposure, but only when pristine communities were absent. In this case, biofilms remained exposed to sufficiently high Cu concentrations to inhibit photosynthetic processes. This may be explained by the lack of a significant decrease in intracellular Cu concentrations over

the entire recovery period, thus prolonging community exposure. In ExCu1, one may argue that immigration processes favoured a process whereby species physiologically affected by the chronic Cu exposure were replaced by more active species, thus explaining the fact that no effect on photosynthetic efficiency in biofilms mixed with pristine communities during the recovery period was observed.

4.3. Recovery of heterotrophic communities

Genetic bacterial diversity (assessed by PCR-ARISA) greatly differed between control and exposed communities, confirming that Cu is a strong driver of bacterial community composition, as previously shown by using PCR-DGGE approaches (Massieux et al., 2004; Boivin et al., 2006; Tlili et al., 2010). Cu had a strong influence on bacterial community composition, which was very stable in the contaminated channels whereas controls showed a marked temporal evolution. Changes in bacterial community composition are generally strongly related to level of exposure to Cu (Massieux et al., 2004; Boivin et al., 2006) or other metals such as Cd, Zn or Ni (Fechner et al., 2011). Regardless of the presence or absence of pristine biofilms, the successional changes within the communities were more marked after the decrease in Cu exposure. Nevertheless, and conversely to diatom communities, bacterial community assemblages remained quite different from controls throughout the 6-week recovery period in both recovery contexts, *i.e.* even when pristine communities were present (*i.e.* when species immigration processes were possible). This result is consistent with the findings of Boivin et al. (2006), who highlighted that copper-induced changes in bacterial community composition persisted during the entire duration of our study (*i.e.* 4 weeks), after a decrease in Cu exposure level despite bacterial re-inoculation *via* water replenishment with natural ditch water. In a translocation experiment, Dorigo et al. (2010a) also observed a weak structural recovery of biofilm bacterial communities despite the marked decrease in pesticide exposure (including copper), the proximity of autochthonous communities and the longer duration of the recovery experiment (*i.e.* 9 weeks). All of these reports point to only limited implementation of immigrated bacterial species in established biofilm communities (Boivin et al., 2006), suggesting that the degree of maturity and thickness of biofilms can greatly influence structural recovery of benthic microbial communities (Dorigo et al., 2010a). However, in the present study, all the bacterial communities tend to converge after 6 weeks, suggesting that structural recovery could have been completed if the observation period would have been longer.

In our study, chronic Cu exposure significantly inhibited β -Glu activity. Given the high influence of algal production on bacterial glucosidase activity in biofilms (Espeland et al., 2001), one may argue that the inhibition of β -Glu activity should reflect an indirect effect of Cu. By decreasing algal biomass, Cu probably indirectly limited the release of dissolved organic substances by phototrophic communities, which is an important source of high quality carbon for bacteria. This hypothesis is partially supported by the concentrations of DOC, which were notably reduced under Cu exposure, even if differences between channels were not statistically significant. This impact was detected from the end of the exposure period, suggesting that functional effects were more rapid on heterotrophic communities than on phototrophic communities. Nevertheless, we found no effect on LAP activity, revealing that the functional response to Cu can vary according to the type of enzymes involved. Cu exposure can thus affect functional diversity, as previously shown by Barranguet et al. (2003) and Boivin et al. (2006) who characterized community-level physiological profiles. Based on β -Glu activity, heterotrophic functional recovery was complete in the two recovery contexts, despite the lack of structural recovery

in the bacterial communities. This confirms the existence of a high degree of functional redundancy for glucose use in microbial communities (Hill et al., 2008). Other studies have previously reported differences between structural and functional recovery following various environmental stresses (Griffiths et al., 2000; Boivin et al., 2006). However, the recovery in β -Glu activity was accelerated when pristine communities were present. This faster recovery in ExCu treatments could be explained by the greater amount of fresh and labile organic matter supplied by pristine communities and rapidly metabolized by pre-exposed communities.

While long-term exposure to Cu clearly inhibited β -Glu activity, no toxic effect was recorded in short-term toxicity tests using β -Glu activity as an endpoint, thus confirming that chronic effects of Cu on β -Glu activity were probably mainly due to indirect effects (as hypothesized above). This is quite surprising given that several authors have successfully completed PICT approaches by measuring β -Glu activity following short-term exposure to increasing Cu concentrations (Fechner et al., 2010; Tlili et al., 2010). We are unable to explain the lack of effect in our toxicity tests, since the range of the Cu concentrations (final concentrations reaching 127 mg L^{-1}) and the duration of exposure (4 h before incubation with the substrate) were quite similar to those previously described (Fechner et al., 2010; Tlili et al., 2010). In contrast, concentration–response curves were obtained for LAP activities whereas no effect was recorded on this parameter during the chronic exposure. After the 4-week exposure period, the chronically exposed community was about 2-fold more tolerant to Cu than the controls. Based on LAP activity measurement, Tlili et al. (2010) also observed an increase in Cu tolerance following a 3-week chronic Cu exposure ($25 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$). However, in our study, the increase in tolerance was only transient, and there were no differences between exposed and non-exposed communities over the last 6 weeks of study. Thus, our results did not allow us to assess possible recovery of the tolerance capacities of heterotrophic microbial communities.

5. Conclusions

This study revealed that the structural and functional recovery of biofilm communities was greatly influenced by the presence or absence of pristine biofilms. However, microbial community responses following the decrease in Cu exposure differed between phototrophic and heterotrophic communities. When pre-exposed biofilms were connected to pristine biofilms, phototrophic communities recovered within 6 weeks, both in terms of biomass, structure and photosynthetic activity. Recovery processes were also detected using the PICT approach, since the tolerance induced during the chronic exposure to Cu totally disappeared during the recovery period. In contrast, all of the Cu-induced changes recorded in phototrophic communities remained present throughout the recovery period in the absence of pristine communities. Our results seem to confirm that immigration processes should play a major role in phototrophic biofilm community recovery.

The presence of pristine communities had less influence on the trajectory of recovery in heterotrophic communities suggesting a limited role of immigration processes. Regardless of the presence or absence of pristine biofilms, the decrease in Cu exposure did not totally abolish Cu-induced changes in bacterial community structure within 6 weeks even if community trajectories suggested partial recovery. In contrast, functional recovery (based on β -Glu activity) was completed in both recovery contexts. This indicates that genetically different bacterial communities can sustain similar ecological functions, especially when considering generalist ones, such as glycosidase activities. It is thus possible that recovery dynamics of more specific functions are more dependent on community structure and diversity.

From an ecological perspective, this study suggests that the recovery of stream microbial biofilm communities following an improvement in water chemical quality would be facilitated in settings where microorganisms can immigrate from previously non-contaminated areas. It would thus be crucial to protect upstream sections from most of the chemical pollution in order to allow the development of pristine biofilms that could colonize downstream sections after chemical restoration.

Acknowledgments

We thank ATT for editing the English-language version of the manuscript. We also thank Bernard Motte and Christophe Rosy for technical support, Arnaud Foulquier for statistical analysis, and the Irstea's Water Chemistry Laboratory (LAMA) for physico-chemical data, and especially Hélène Sanejouand for nutrient analysis and Josiane Gahou and Eloïse Vray for copper analysis.

This project was supported by funding from the French National Office for the Aquatic Environment (ONEMA-ONEMA-CEMAGREF agreement, action 26, "Remédiation de l'effet de pesticides").

References

- Barranguet, C., van den Ende, F.P., Rutgers, M., Breure, A.M., Greijdenus, M., Sinke, J.J., Admiraal, W., 2003. Copper-induced modifications of the trophic relations in riverine algal-bacterial biofilms. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22, 1340–1349.
- Battin, T.J., Kaplan, L.A., Newbold, J.D., Hansen, C.M.E., 2003. Contributions of microbial biofilms to ecosystem processes in stream mesocosms. *Nature* 426, 439–441.
- Blanck, H., Wängberg, S.A., Molander, S., 1988. Pollution-induced community tolerance – a new ecotoxicological tool. In: Cairns, J., Pratt, J.R. (Eds.), *Functional Testing of Aquatic Biota for Estimating Hazards of Chemicals*, pp. 219–230. Philadelphia, ASTM STP 988.
- Boivin, M.E.Y., Massieux, B., Breure, A.M., Greve, G.D., Rutgers, M., Admiraal, W., 2006. Functional recovery of biofilm bacterial communities after copper exposure. *Environmental Pollution* 140, 239–246.
- Bossuyt, B.T.A., Janssen, C.R., 2004. Long-term acclimation of *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) Hindak to different copper concentrations: changes in tolerance and physiology. *Aquatic Toxicology* 68, 61–74.
- Cid, A., Herrero, C., Torres, E., Abalde, J., 1995. Copper toxicity on the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum*: effects on photosynthesis and related parameters. *Aquatic Toxicology* 31, 165–174.
- Depledge, M.H., 1999. Recovery of ecosystems and their components following exposure to pollution. *Journal of Aquatic Stress and Recovery* 6, 199–206.
- Dorigo, U., Bérard, A., Rimet, F., Bouchez, A., Montuelle, B., 2010a. In situ assessment of periphyton recovery in a river contaminated by pesticides. *Aquatic Toxicology* 98, 396–406.
- Dorigo, U., Bérard, A., Bouchez, A., Rimet, F., Montuelle, B., 2010b. Transplantation of microbenthic algal assemblages to assess structural and functional recovery after diuron exposure. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 59, 555–563.
- Espeland, E.M., Francoeur, S.N., Wetzel, R.G., 2001. Influence of algal photosynthesis on biofilm bacterial production and associated glucosidase and xylosidase activities. *Microbial Ecology* 42, 524–530.
- Fechner, L.C., Gourlay-Francé, C., Uher, E., Tusseau-Vuillemin, M.H., 2010. Adapting an enzymatic toxicity test to allow comparative evaluation of natural freshwater biofilms' tolerance to metals. *Ecotoxicology* 19, 1302–1311.
- Fechner, L.C., Gourlay-Francé, C., Tusseau-Vuillemin, M.H., 2011. Low exposure levels of urban metals induce heterotrophic community tolerance: a microcosm validation. *Ecotoxicology* 20, 793–802.
- Griffiths, B.S., Ritz, K., Bardgett, R.D., Cook, R., Christensen, S., Ekelund, F., Sørensen, S.J., Baath, E., Bloem, J., De Ruiter, P.C., Dolfing, J., Nicolardot, B., 2000. Ecosystem response of pasture soil communities to fumigation-induced microbial diversity reductions: an examination of the biodiversity–ecosystem function relationship. *Oikos* 90, 279–294.
- Guasch, H., Sabater, S., 1998. Light history influences the sensitivity to atrazine in periphytic algae. *Journal of Phycology* 34, 233–241.
- Guasch, H., Paulsson, M., Sabater, S., 2002. Effect of copper on algal communities from oligotrophic calcareous streams. *Journal of Phycology* 38, 241–248.
- Guasch, H., Navarro, E., Serra, A., Sabater, S., 2004. Phosphate limitation influences the sensitivity to copper in periphytic algae. *Freshwater Biology* 49, 463–473.
- Hill, P.W., Farrar, J.F., Jones, D.L., 2008. Decoupling of microbial glucose uptake and mineralization in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 40, 616–624.
- Ihaka, R., Gentleman, R., 1996. R: a language for data analysis and graphics. *Journal of Computational and Graphical Statistics* 5, 299–314.
- Ivorra, N., Hettelaar, J., Tubbing, G.M.J., Kraak, M.H.S., Sabater, S., Admiraal, W., 1999. Translocation of microbenthic algal assemblages used for *in situ* analysis of metal pollution in rivers. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 37, 19–28.
- Krammer, K., Lange-Bertalot, H., 1986–1991. *Bacillariophyceae* 1. Teil: Naviculaceae, 2. Teil: Bacillariaceae, Epithemiaceae, Surirellaceae, 3. Teil: Centrales, Fragilariaceae, Eunotiaceae, 4. Teil: Achnantheaceae. In: *Kritische Ergänzungen zu Navicula* (Lineolatae) und *Gomphonema*. G. Fischer Verlag, Stuttgart.
- Laviale, M., Prygiel, J., Créach, A., 2010. Light modulated toxicity of isoproturon toward natural stream periphyton photosynthesis: a comparison between constant and dynamic light conditions. *Aquatic Toxicology* 97, 334–342.
- Massieux, B., Boivin, M.E.Y., van den Ende, F.P., Langenskiöld, J., Marvan, P., Barranguet, C., Admiraal, W., Laanbroek, H.J., Zwart, G., 2004. Analysis of structural and physiological profiles to assess the effects of Cu on biofilm microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 4512–4521.
- Montuelle, B., Dorigo, U., Bérard, A., Volat, B., Bouchez, A., Tlili, A., Gouy, V., Pesce, S., 2010. The periphyton as a multimetric bioindicator for assessing the impact of land use on rivers: an overview of the Ardères-Morcille experimental watershed. *Hydrobiologia* 657, 123–141.
- Morin, S., Pesce, S., Tlili, A., Coste, M., Montuelle, B., 2010. Recovery potential of periphytic communities in a river impacted by a vineyard watershed. *Ecological Indicators* 10, 419–426.
- Ranjard, L., Poly, F., Lata, J.C., Mougél, C., Thioulouse, J., Nazaret, S., 2001. Characterization of bacterial and fungal soil communities by automated ribosomal intergenic spacer analysis fingerprints: biological and methodological variability. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 4479–4487.
- Romani, A.M., Guasch, H., Munoz, I., Ruana, J., Vilalta, E., Schwartz, T., Emtiaz, F., Sabater, S., 2004. Biofilm structure and function and possible implications for riverine DOC dynamics. *Microbial Ecology* 47, 316–328.
- Rotter, S., Sans-Piché, F., Streck, G., Altenburger, R., Schmitt-Jansen, M., 2011. Active bio-monitoring of contamination in aquatic systems – an *in situ* translocation experiment applying the PICT concept. *Aquatic Toxicology* 101, 228–236.
- Roussel, H., Ten-Hage, L., Joachim, S., Le Cohu, R., Gauthier, L., Bonzom, J.M., 2007. A long-term copper exposure on freshwater ecosystem using lotic mesocosms: primary producer community responses. *Aquatic Toxicology* 81, 168–182.
- Sabater, S., Guasch, H., Ricart, M., Romani, A., Vidal, G., Klünder, C., Schmitt-Jansen, M., 2007. Monitoring the effect of chemicals on biological communities. The biofilm as an interface. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387, 1425–1434.
- Schmitt-Jansen, M., Altenburger, R., 2008. Community-level microalgal toxicity assessment by multiwavelength-excitation PAM fluorometry. *Aquatic Toxicology* 86, 49–58.
- Serra, A., Guasch, H., 2009. Effects of chronic copper exposure on fluvial systems: linking structural and physiological changes on fluvial biofilms with the in-stream copper retention. *Science of the Total Environment* 407, 5274–5282.
- Serra, A., Guasch, H., Admiraal, W., Van der Geest, H.G., Van Beusekom, S.A.M., 2010. Influence of phosphorus on copper sensitivity of fluvial periphyton: the role of chemical, physiological and community-related factors. *Ecotoxicology* 19, 770–780.
- Soldo, D., Behra, R., 2000. Long-term effects of copper on the structure of freshwater periphyton communities and their tolerance to copper, zinc, nickel and silver. *Aquatic Toxicology* 47, 181–189.
- Stauber, J.L., Florence, T.M., 1987. Mechanism of toxicity of ionic copper and copper complexes to algae. *Marine Biology* 94, 511–519.
- Stevenson, R.J., Peterson, C.G., 1989. Variation in benthic diatom (Bacillariophyceae) immigration with habitat characteristics and cell morphology. *Journal of Phycology* 25, 120–129.
- Stevenson, R.J., Peterson, C.G., 1991. Emigration and immigration can be important determinants of benthic diatom assemblages in streams. *Freshwater Biology* 26, 279–294.
- Tlili, A., Bérard, A., Roulier, J.L., Volat, B., Montuelle, B., 2010. PO_4^{3-} dependence of the tolerance of autotrophic and heterotrophic biofilm communities to copper and diuron. *Aquatic Toxicology* 98, 165–177.
- Tlili, A., Corcoll, N., Bonet, B., Morin, S., Montuelle, B., Bérard, A., Guasch, H., 2011. In situ spatio-temporal changes in pollution-induced community tolerance to zinc in autotrophic and heterotrophic biofilm communities. *Ecotoxicology*, doi:10.1007/s10646-011-0721-2.
- Tolcach, E.R., Gómez, N., 2002. Effect of translocation of microbenthic communities in a polluted lowland stream. *Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie* 28, 254–258.

Diatom immigration drives biofilm recovery after chronic copper exposure

SOIZIC MORIN*, ANNE-SOPHIE LAMBERT[†], JOAN ARTIGAS[†], MARINA COQUERY[†] AND STÉPHANE PESCE[†]

*Irstea, UR REBX, 50 avenue de Verdun, Cestas cedex, France

[†]Irstea, UR MALY, 3 bis quai Chauveau, Lyon cedex, France

SUMMARY

1. The impact of immigration on the recovery of diatom assemblages after chronic exposure to copper was investigated in laboratory microcosms.
2. We examined the recovery trajectories of copper-contaminated biofilms after reducing copper stress and with or without the possibility of immigration from unimpaired communities.
3. The biofilms mixed with unimpaired communities returned to a 'control' assemblage structure within 6 weeks, with recovery patterns depending on the endpoint considered (i.e. 2 weeks for relative abundances of diatom species but 6 weeks for total diatom biomass). In contrast, no recovery was observed in assemblages placed under control conditions without external immigrants.
4. Immigration has important effects on the recovery of quantitative and qualitative characteristics of biofilms.

Keywords: diatoms, biofilm, recovery, copper, immigration, recolonisation

Introduction

In the early 1990s, Stevenson & Peterson (1989, 1991) studied the emigration and immigration of benthic diatoms as determinants of periphytic communities in streams. Since their work, the influence of immigration in freshwater benthic systems has mainly been considered in relation to recovery following sharp changes in flow regime, that is, spate (Stevenson, 1990; Peterson & Stevenson, 1992; Peterson, 1996) or episodes of drought (Benenati, Shannon & Blinn, 1998; Bambakidis, 2009).

Translocation studies are increasingly used to assess the recovery potential of riverine periphytic communities (biofilms). They are generally performed by transferring biofilms from contaminated sites to uncontaminated sites upstream of the contamination source (Tolcach & Gómez, 2002; Dorigo *et al.*, 2010; Morin *et al.*, 2010a; Rotter *et al.*, 2011), but sometimes by transplanting contaminated communities to a neighbouring river with similar environmental conditions (Ivorra *et al.*, 1999). Depending on the study, the time for full recovery of diatom assemblage structure has been estimated at from as little as two

(Tolcach & Gómez, 2002) to over 9 weeks (Dorigo *et al.*, 2010). The contribution of immigration to recovery after the episodes of contamination is often questioned in translocation experiments and ecotoxicological studies in general (e.g. Ivorra *et al.*, 1999; Morin *et al.*, 2010a). However, it remains virtually impossible to discriminate between the effects of regrowth from remaining viable cells and colonisation by new immigrants.

Here, we performed an experimental study designed to assess the relative contribution of drift to the recovery of diatom assemblages from copper exposure. A series of laboratory channels were used to grow biofilms under control and Cu-contaminated conditions, prior to simulating the recovery of exposed assemblages with and without connectivity to unimpaired biofilms (i.e. allowing or not species immigration from a pristine community). Total diatom biomass and species relative abundances were monitored. In addition, a range of descriptors for assessing diatom population dynamics (daily rates of increase in diatom density, estimation of population growth) were determined to identify the ecological importance to the recovery of immigration as distinct from regrowth from remnant cells.

Methods

Experimental set-up

A suspension of natural biofilm from a pristine site located upstream of any pollution inputs in the Morcille river (Beaujolais region, Eastern France) was inoculated into 12 laboratory channels ($l \times w \times d = 63 \times 11 \times 4$ cm). These channels were arranged in a blocked design into four sets of triplicate channels, two of which were grown under control conditions (see details in Lambert *et al.*, 2012) while the other two were supplemented with copper at about $20 \mu\text{g L}^{-1}$ for 4 weeks to obtain mature biofilms before the experiment. The channels were placed in parallel, at a light intensity of approximately 3500 lux (13:11 light/dark regime), under continuous water flow in recirculating mode (centrifugal pumps Rena Flow 600, 1.2 L min^{-1}). The copper concentrations used in this experiment were sufficient to produce effects on the assemblages (allowing for the study of recovery), but still environmentally realistic (such concentrations are occasionally measured downstream in the Morcille river: see Montuelle *et al.*, 2010). In each channel, microscope glass slides were immersed to allow biofilm settlement and harmonise sampling conditions (similar substratum characteristics, constant surface area) throughout the experiment. The diatom assemblage inoculum was composed of at least 57 species, dominated by *Nitzschia hantzschiana* Rabenhorst (more than 80% relative abundance) followed by *Achnanthes minutissimum* (Kützinger) Czarnecki, *Nitzschia capitellata* Hustedt, *Fragilaria capucina* Desmazières var. *capucina* and *Planorthis lanceolatus* (Brébisson ex Kützinger) Lange-Bertalot.

During the 6 weeks of recovery, four different treatments (each with three replicates) were tested (Fig. 1): (i) Control treatment: a set of $n = 3$ uncontaminated channels kept under uncontaminated water; (ii) Cu treatment: a set of $n = 3$ Cu-contaminated channels kept exposed to about $20 \mu\text{g Cu L}^{-1}$; (iii) ExCu1 treatment: set of channels with biofilms grown under control conditions placed in the upstream half-section of the channels and biofilms grown under Cu-contaminated conditions placed in the downstream section, filled with uncontaminated water; (iv) ExCu2 treatment: set of biofilms grown under Cu-contaminated conditions and filled with uncontaminated water. The ExCu1 and ExCu2 treatments were used to assess the recovery of diatom assemblages following a decrease in Cu exposure, with (ExCu1) or without (ExCu2) the possibility of diatom immigration from 'control' assemblages to the impacted biofilms.

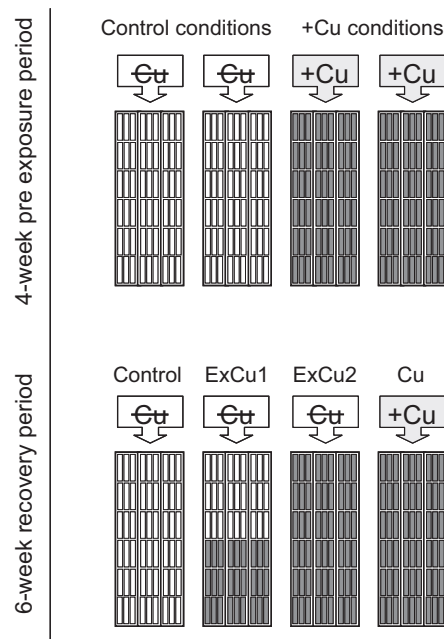


Fig. 1 Experimental set-up during exposure and recovery periods. Biofilms grown under control conditions are in white (no Cu added in water) and under contaminated conditions in grey (channels supplemented with Cu).

Water analyses

All physicochemical parameters were monitored every 2 weeks, before and after the water was changed. For water changes, groundwater containing a very low Cu concentration ($<0.3 \mu\text{g L}^{-1}$) was adjusted to the conductivity (i.e. $600 \mu\text{S cm}^{-1}$) and nutrient concentrations (i.e. about 4 mg Si L^{-1} , $5 \text{ mg NO}_3 \text{ L}^{-1}$, $0.05 \text{ mg PO}_4 \text{ L}^{-1}$) of the sampling site. In the Cu-contaminated channels, the water was supplemented with $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ to obtain the nominal concentration of $20 \mu\text{g Cu L}^{-1}$.

Conductivity, pH, temperature and oxygen concentration were measured *in situ* in each series of channels using suitable probes (WTW Meters, Weilheim, Germany). Water samples were taken to analyse nutrient content (NO_2 , NO_3 , NH_4 , PO_4 , SiO_2) and copper concentration. Nutrients were determined following French standards (AFNOR operating procedures and protocols). Dissolved Cu concentrations were analysed by ICP-MS (X Series II, Thermo Electron, UK) after the filtration of a 30-mL sample ($0.45 \mu\text{m}$ PVDF, Whatman) and acidification with 0.5% nitric acid (Suprapur, Merck).

Algal biomass and diatom analysis

Biofilm samples (five glass slides) were collected in each replicate channel every 2 weeks from week 0 to week

6). In the ExCu1 treatment, channel samples were always collected in the 'downstream' section, corresponding to biofilms previously exposed to copper (Fig. 1). The five slides were carefully scraped using a razor blade and the biofilms pooled and suspended in a standard volume of mineral water (Volvic, France). After homogenisation of the resulting suspensions, aliquots were taken for fluorescence measurements (as a proxy of total algal biomass and of diatoms) and diatom taxonomic identification. Chlorophyll-*a* fluorescence (Chl) emitted by diatoms was determined by the measurements using a PhytoPAM fluorometer (Walz, Effeltrich, Germany) equipped with the PhytoEDF emitter-detector unit, performed on fresh material (as described in Morin *et al.*, 2010b). Data were then converted into $\mu\text{g Chl cm}^{-2}$. Subsamples for diatom identification were preserved in a formalin solution (4%, v/v) and prepared according to standard NF EN 13946. Briefly, organic matter was removed from the samples by digestion in boiling hydrogen peroxide (30% H_2O_2) followed by rinsing and successive cycles of centrifugation and resuspension in distilled water to remove any residual peroxide. Clean material was then pipetted onto cover-slips and allowed to dry before being mounted with a high refractive index mountant (Naphrax, Brunel Microscopes Ltd, UK) for microscopic identification ($\times 1000$ magnification on a Leica DMRB photomicroscope, Wetzlar, Germany). At least 400 individual diatoms were identified to the lowest taxonomical level possible. The primary references used were Krammer & Lange-Bertalot (1986–1991) and the Diatoms of Europe series (A.R.G. Gantner Verlag K.G, Ruggell). Relative abundance of the taxa identified was recorded (RA, in %); when deformed individuals were observed, their percentage was also determined.

Data treatment

Between-channel differences in physicochemical variables were tested with one-way ANOVA and Tukey's *post hoc* HSD test using Statistica software (v5.1, StatSoft, France).

Linear mixed effects (LME) models were applied on the biological endpoints (total diatom biomass, species richness, proportion of diatom deformities) to differentiate between the effects of sampling date, treatment and their combination. Treatments and dates were set as fixed effects and the samples taken from each artificial channel as random effects. The analyses were performed using the NLME library implemented within the R Environment (<http://cran.r-project.org/>).

Samples were ordinated by cluster analysis (Bray–Curtis similarities) on the basis of diatom species composition (PC-Ord v4.25, MjM Software, USA).

Diatom biomass values measured through fluorescence were used to convert taxon counts (RA) into biomass values for the dominant species and abnormal valves (expressed in $\mu\text{g Chl cm}^{-2}$). On the basis of these data, daily rates of increase (r , in cell doublings/day) during the exponential growth phase were calculated using the slope of the line relating time and natural log biomass according to Wood, Everroad & Wingard (2005). Probability values of the linear regressions were calculated to determine whether growth was significant, before investigating the differences between treatments in the total diatom biomass, dominant species found and abnormal forms.

Two-week population growth (written as Δpop) was determined for each treatment and pair of consecutive sampling dates to estimate the impact of immigration. Δpop was determined by two factors: net fecundity (reproduction–death) and net immigration (immigration–emigration). Net fecundity and immigration may differ according to environmental conditions (Control versus Cu), thus ANOVA comparisons were only performed for ExCu1 and ExCu2 to assess the differences in net immigration. As they shared a comparable contamination history, the differences in growth between ExCu1 and ExCu2 corresponded to the immigration that occurred only in ExCu1 (immigration of species from the 'upstream' to the 'downstream' slides, only the latter being sampled) and were thus taken as an estimate of the potential influence of immigration.

Results

Water

Physicochemical variables varied little among treatments (Table 1), with the exception of SiO_2 and Cu concentrations that differed significantly (ANOVA, d.f. = 25; $P = 0.003$, $F = 6.36$ and $P < 0.001$, $F = 44.80$, respectively). Silicate concentrations were lower in Control samples because of marked decreases (*c.* 70%) between water changes, compared with ExCu2 and Cu channels; intermediate values were recorded in ExCu1. Copper concentrations were significantly higher in the Cu-treated channels ($16.6 \pm 1.4 \mu\text{g L}^{-1}$), and no statistically significant difference was found between Control, ExCu1 and ExCu2 channels, even though the two latter channels had slightly higher concentrations of Cu ($4.2 \pm 0.9 \mu\text{g L}^{-1}$).

Table 1 Mean values (\pm SE, $n = 3$) of physicochemical parameters of the water in the four series of channels, determined during the 6-week recovery period

	Control	Ex-Cu1	Ex-Cu2	Cu
Conductivity ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	106 \pm 12	97 \pm 11	99 \pm 11	106 \pm 12
O ₂ (mg L ⁻¹)	7.9 \pm 0.6	8.0 \pm 0.7	8.4 \pm 0.8	7.9 \pm 0.8
pH	7.9 \pm 0.1	7.9 \pm 0.1	7.8 \pm 0.1	7.8 \pm 0.1
Temperature (°C)	20.6 \pm 0.4	21.2 \pm 0.5	20.9 \pm 0.5	20.7 \pm 0.4
NH ₄ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	17.4 \pm 2.8	17.0 \pm 3.3	20.3 \pm 5.4	18.7 \pm 4.1
NO ₂ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	23.1 \pm 4.9	30.3 \pm 7.2	41.7 \pm 7.2	41.4 \pm 8.0
NO ₃ (mg L ⁻¹)	2.3 \pm 0.7	2.6 \pm 0.8	2.6 \pm 0.8	2.3 \pm 0.7
PO ₄ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	52.9 \pm 16.3	78.3 \pm 14.3	63.3 \pm 18.7	60.0 \pm 6.7
SiO ₂ (mg L ⁻¹)	2.1 \pm 0.6 ^a	4.8 \pm 0.5 ^{a,b}	6.9 \pm 1.3 ^b	7.0 \pm 1.3 ^b
Cu ($\mu\text{g L}^{-1}$)	1.4 \pm 0.5 ^a	3.4 \pm 1.2 ^a	4.9 \pm 1.6 ^a	16.6 \pm 1.4 ^b

Letters in superscript following SiO₂ and Cu values indicate statistical differences between treatments (Tukey's HSD test; $P < 0.01$).

Diatom assemblages

Biomass of diatoms (Fig. 2) represented $87.5 \pm 0.5\%$ of that of the overall phototrophic assemblage in the Control channels, against $36.0 \pm 1.4\%$ in Cu-exposed channels. Statistical differences in biomass were observed between treatments ($P < 0.001$), and a significant increase with time was noted ($P = 0.022$ in week 2, $P < 0.001$ in weeks 4 and 6). The proportion of diatoms increased in ExCu1 from $42.1 \pm 0.3\%$ initially to $82.7 \pm 3.7\%$ in week 6 and reached a comparable diatom biomass to Controls ($P = 0.058$), whereas in ExCu2 it was stable and significantly lower ($P < 0.001$), at $44.1 \pm 2.3\%$ throughout the experiment.

Species richness was significantly lower in the Controls than in the other treatments (18 ± 1 vs 21 ± 1 , $P = 0.024$) and tended to decrease over time (time effect on week 6, 17 ± 1 species, $P < 0.001$). The classification based on diatom species relative abundance (Fig. 3) clearly distinguished two sets of data:

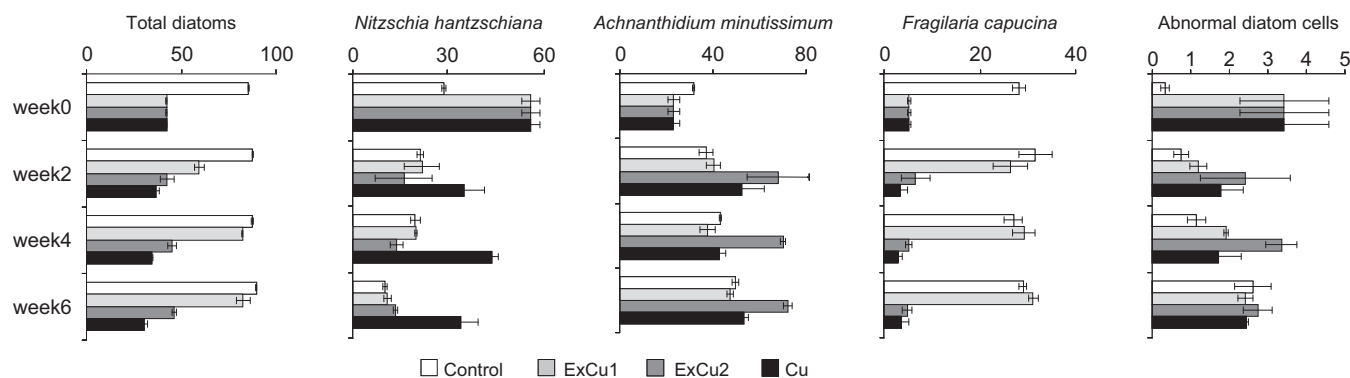
1. Control and ExCu1 biofilms had comparable assemblages (upper branch of the cluster in Fig. 3); within this group, the samples were then classified according to sampling date. The assemblage was composed mainly of *Achnanthes minutissimum* ($41 \pm 2\%$), *Fragilaria capucina* ($29 \pm 1\%$), *Nitzschia hantzschiana* ($19 \pm 2\%$) and a number of accompanying *Achnanthes* species (*A. affine* [Grunow] Czarnecki, *A. gracillimum* [Meister] Lange-Bertalot and *A. macrocephalum* [Hustedt] Round and Bukhtiyarova) accounting for about 5% of cumulated abundances.

2. Cu and ExCu2 communities composed the lower branch of the cluster, in which ExCu2 samples were all grouped together, except one (week 2, that was grouped with Cu samples). Relative abundance of species was less even, as *Achnanthes minutissimum* ($53 \pm 4\%$) and *Nitzschia hantzschiana* ($30 \pm 4\%$) tended to dominate whereas *Fragilaria capucina* abundances markedly decreased ($6 \pm 1\%$). In the subcluster of ExCu2 samples (all but one, corresponding to week2), separation was attributed to a dominance of *A. minutissimum* ($67 \pm 4\%$) over *N. hantzschiana* ($14 \pm 1\%$) and *F. capucina* ($8 \pm 3\%$).

Initial percentages of diatom deformities were higher in Cu channels than in the Controls ($P < 0.001$, Fig. 2). Linear mixed effects analysis revealed significant treatment \times date effects, as well as statistically higher abundances of deformed cells on week 6 ($P = 0.003$).

Rates of increase in cell numbers and population dynamics

Daily rates of increase (Fig. 4) in total diatom numbers were positive in all treatments, except for Cu channels where no significant growth was noticeable. Rates of increase (r values) were highest in ExCu1 channels (three times the Control values) and were related mainly to increased growth of *Achnanthes minutissimum* and *Fragilaria capucina* populations. In ExCu2, *Nitzschia hantz-*

**Fig. 2** Proportion of diatoms and relative abundance of the dominant diatom species and abnormal individuals over the course of the experiment. All data are expressed in % (in the case of total diatoms, % of the total algal community).

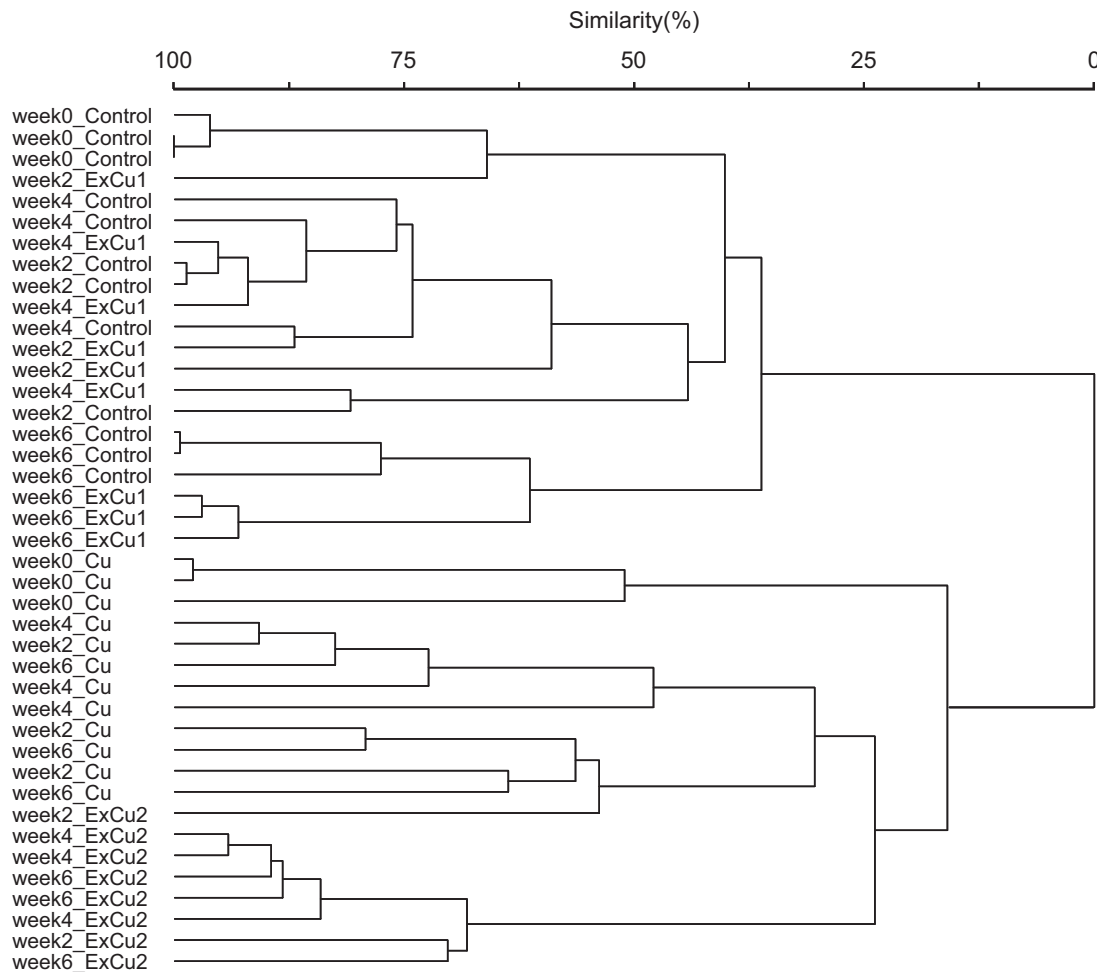


Fig. 3 Cluster analysis of the samples based on diatom species relative abundance. Only the taxa representing more than 1% relative abundance in at least one sample are taken into account. See Fig. 2 for abundance of the dominant species on each sampling date.

schiana declined (i.e. r values were negative); the highest r values were recorded for *A. minutissimum*. This species grew significantly in all channels, even Cu-contaminated ones. Values of r for abnormal diatom cells were positive in all Control, ExCu1 and ExCu2 channels, whereas their quantity remained stable in Cu channels (no significant growth). This growth of abnormal cells in Control, ExCu1 and ExCu2 channels led all the treatments to reach similar proportions of diatom deformities at the end of the experiment, that is, $2.6 \pm 0.1\%$ (Fig. 2), which is significantly higher than the initial percentages detailed above.

Table 2 summarises mean population growth parameters for all the treatments over the experimental period. Subscripts in equations refer to the water conditions to indicate that net fecundity (nF) of the standing crop, as well as immigration (I) and emigration (E), differed according to environmental factors. No significant self-generated detachment (Boulétreau *et al.*, 2006) was observed in the biofilms, suggesting that the emigration

component was probably comparable between treatments. Two-week Δ pop was always lower under Cu conditions, agreeing with the r calculations. Comparisons between ExCu1 and ExCu2 population kinetics indicated statistical differences (linked to significant immigration) for total diatom biomass and *Fragilaria capucina* (respectively $P = 0.006$ and $P < 0.001$; d.f. = 23, $F = 9.22$).

Discussion

Structural recovery after copper pressure ceased

Diatoms dominated in the Control channels but were less well represented in Cu-exposed channels (Fig. 2). Chronic exposure to copper is known to cause a shift towards dominance by green algae (Serra & Guasch, 2009; Tlili *et al.*, 2010): indeed, Cu samples on week 0 were composed of $47 \pm 5\%$ green algae. ExCu1 communities, because of increased diatom cell doublings (Fig. 4),

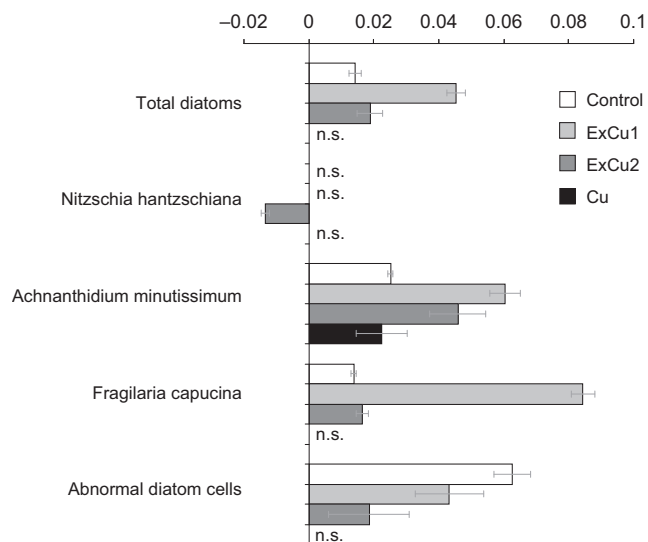


Fig. 4 Mean rates of increase (in cell doublings/day) over the 6-week experimental period of the global diatom assemblage (total diatoms), dominant species and abnormal cells. n.s., non-significant ($P > 0.05$).

progressively reached the Control algal composition, while ExCu2 communities remained close to Cu-exposed composition.

Focussing on assemblage structure of diatoms in more detail, a selection of species less susceptible to copper exposure occurred in the biofilms exposed to Cu, that is, *Achnanthes minutissimum* or *Nitzschia capitellata* (Verb & Vis, 2005; Duong *et al.*, 2008; Morin, Coste & Delmas, 2008b; Morin *et al.*, 2012). Figure 3 indicates that 2 weeks were more than enough for ExCu1 assemblages to attain structure similar to the Controls, in accordance with the most optimistic *in situ* translocation scenarios (Tolcach & Gómez, 2002). Without any external supply of colonists, ExCu2 assemblage structure tended to diverge from the Cu-stressed state but did not reach the Control composition within the time-course of the experiment. It followed a trajectory that was probably driven by *in situ* differential reproduction of species selected by previous Cu exposure and subsequently favoured by the new

(uncontaminated) environmental conditions. The slower increase in periphytic biomass in ExCu2 channels did not lead to such a strong decrease in local contamination (i.e. Cu concentration in the biofilm) as in ExCu1 (Lambert *et al.*, 2012), thus maintaining somewhat greater toxic pressure. This could explain why the succession trajectory of ExCu2 assemblages were mainly driven by a massive growth of *Achnanthes minutissimum*, a pioneer species (Stevenson, 1990; Medley & Clements, 1998) that is known to cope with metal contaminations (Morin *et al.*, 2012) and to the decline of the copper-tolerant *Nitzschia hantzschiana*, which is probably less competitive than other species when water contamination ceases. Although deriving from a natural inoculum, the original assemblage was quite simple from the outset. The selection that occurred, along with the laboratory conditions used, meant that the assemblages studied here were closer to 'model assemblages' than to the intricate structures that can be expected in nature. However, the trends observed here can be expected to be similar in more complex assemblages.

Interestingly, the percentage of diatom abnormalities remained fairly stable in the ExCu2 and Cu channels throughout the experiment. No significant increase in r values was observed in Cu treatments (Fig. 4), suggesting that species affected by deformities were unable to reproduce, which is additional evidence for metal-induced genetic impairments (Falasco *et al.*, 2009) that are likely to affect cell division (Schmid, 1984). Accrual of abnormal diatoms in ExCu2 (positive r values) apparently contradicts this statement, but in this case can be compared with the clear kinetics of increasing deformities observed in Control and ExCu1 channels. Long-term culture under laboratory conditions has been shown to be responsible for cell deformations (Estes & Dute, 1994; Torgan *et al.*, 2006), which could explain the antagonistic results above. Nevertheless, the relative abundance of deformed diatoms had stabilised at about $2.6 \pm 0.1\%$ by week 6 in all treatments.

Table 2 Mean (\pm SE) values of 2-week variations in population and the corresponding formula of the Δ pop. Δ pop = nF (net fecundity: reproduction – death) + I (immigration) – E (emigration)

Two-week Δ pop ($\mu\text{g Chl cm}^{-2}$)	Control	Cu	ExCu1	ExCu2	Immigration
Equation	$nF_{CC}-E_{CC}$	$nF_{CU}-E_{CU}$	$nF_{EX}+I_{EX}-E_{EX}$	$nF_{EX}-E_{EX}$	I_{EX}
Total diatoms	5.3 ± 1.9	0.3 ± 0.4	6.8 ± 1.4	1.7 ± 0.7	5.1 ± 1.6
NHAN	-0.7 ± 0.7	-0.2 ± 0.3	0.2 ± 0.6	-0.3 ± 0.2	0.5 ± 0.7
ADMI	3.9 ± 0.8	0.6 ± 0.4	3.5 ± 0.5	1.6 ± 0.8	1.8 ± 0.9
FCAP	1.6 ± 0.7	-0.0 ± 0.1	2.5 ± 0.4	0.1 ± 0.1	2.4 ± 0.4

Letters in subscript refer to specific environmental conditions (CC, Control conditions; CU, Copper conditions; EX, ExCu1 and 2 conditions). I_{EX} values in italics are non-significant. NHAN, *Nitzschia hantzschiana*; ADMI, *Achnanthes minutissimum*; FCAP, *Fragilaria capucina*.

The role of immigration in diatom assemblage recovery

It is almost impossible to distinguish between biotic and abiotic drivers in *in situ* experiments, but the abiotic drivers are generally considered as the major structuring components for natural communities (Stevenson, Bothwell & Lowe, 1996; Sabater, 2009). In this respect, biofilm recovery after toxicant reduction would result in a rearrangement in the abundances of the remaining viable organisms (differential regrowth), whereas recolonisation by upstream drift would rebuild an assemblage comprising those taxa that coped with the toxic stress plus immigrants. The residual biofilm including the surviving species would probably make the surface rougher and stickier than bare surfaces, and thus produce autogenic habitats favouring quicker recolonisation (Peterson, Hoagland & Stevenson, 1990). Moreover, the initially dominant species may enhance the ultimate development of late-successional species through facilitation (M. Bottin, pers. comm.).

In this study, we differentiated between the effects of a reduction in toxic stress and of inputs of immigrants on the recovery process. Whatever the treatment (ExCu1, ExCu2), the biofilms remaining after one month of Cu exposure contained enough viable organisms to ensure there was no lag time in regrowth (data not shown). We found clear differential trajectories from previously exposed to unexposed diatom assemblage structure in the ExCu1 and ExCu2 channels. In ExCu1, connection with unstressed assemblages led to extremely rapid recovery. Conversely, recovery was delayed for ExCu2 biofilms, which were still unable to attain a comparable diatom species composition to Control biofilms even after 6 weeks under uncontaminated conditions. Iserentant & Blancke (1986) attributed changes in diatom assemblages after transplantation to differential development/proliferation of the species that had already settled. However, the quick recovery observed here of ExCu1 in terms of species composition (within 2 weeks for diatom species relative abundances and 6 weeks for diatoms chlorophyll-*a*) demonstrates that immigration is important in the dynamics of recovery. The role of species drift in recovery thus has to be considered, even if the present very optimistic scenario probably resulted from the experimental design promoting dispersal and high connectivity (the proximity and high density of potential immigrants, very few water renewals, and intermediate water flow) enhancing potential immigration and subsequent algal succession (Stevenson, 1983; McCormick & Stevenson, 1991; Rolland *et al.*, 1997).

Higher reproduction rates in Control and ExCu1 channels can be inferred from increased silica consumption (Table 1). *In situ* reproduction of immigrants, although not easily measurable, is assumed to have substantially contributed to the above-mentioned recovery process. Indeed, biofilm diatoms show rapid reproduction (Baars, 1983; Morin, Coste & Delmas, 2008a), resulting in an increase in the density of the newly introduced organisms. Studies on interspecific variation in diatom immigration (Stevenson & Peterson, 1991) indicated that *Achnanthes minutissimum* immigration was double that for *Fragilaria* species; thus, the massive growth of *F. capucina* in ExCu1 probably resulted from immigration and subsequent reproduction of highly productive individuals originating from unimpaired biofilms. Ultimately, immigration and *in situ* reproduction of both persistent and recolonising species, although undistinguishable, play a major role in periphytic recovery after exposure to copper pollution.

Ecological importance of preserving longitudinal connectivity in streams

Current freshwater management plans (e.g. EU Water Framework Directive -2000/60/EC-, EU River Basin Management Plans or Wenger, 2002) underline the importance of preserving river corridors as major 'monitoring tools' for ecological restoration of freshwater hydroecosystems. Indeed, the proximity of unimpacted areas within catchments is believed to increase effective recovery of connected impaired sites. In this study, we indirectly assessed the gain in remediation efforts by characterising the differential recovery of diatom assemblages (ExCu1 and ExCu2) after a chronic exposure to copper. Water contamination by micropollutants is recognised as a major issue in the EU, and our results support the qualitative importance of maintaining river corridors. Overall, both immigration and *in situ* reproduction, although undistinguishable, enhanced periphytic recovery after exposure to copper pollution (ExCu1 treatment). In the wider perspective of restoring ecosystem integrity, maintaining intact reaches upstream would maximise the potential for downstream sites to recover from past contamination or after unexpected toxicant releases.

The findings reported here also demonstrated that diatom assemblages can recover largely by propagule immigration and *in situ* reproduction of recolonising species. As might be expected, the immigrants here were species known as pioneers that are resistant to disturbances (e.g. *Achnanthes minutissimum*; Peterson &

Stevenson, 1992) and common in the upstream site from which they originated (Morin *et al.*, 2010a; Roubeix *et al.*, 2011). These results could also highlight the risks of high dispersability and potential to establish the undesirable diatoms, such as invasive species that immigrate readily, grow quickly and are highly competitive (Keller & Lodge, 2009; Friberg *et al.*, 2011). In a context of global change, such exotic species could be favoured by multiple stresses reinforced by environmental warming and consequently outcompete or even replace native species (Coste & Ector, 2000).

Acknowledgments

The authors thank Bernard Motte and Christophe Rosy for technical support, the Irstea's Water Chemistry Laboratory (LAMA) for physicochemical data, Hélène Sanejouand for nutrient analysis, and Josiane Gahou and Eloïse Vray for copper analysis. Prof. Alan Hildrew is acknowledged for his contributions that substantially improved the manuscript.

This project was supported by funding from the French National Office for the Aquatic Environment (ONEMA).

References

- Baars J.W. (1983) Autoecological investigations on freshwater diatoms. 1. Generation times of some species. *Archiv für Hydrobiologie - Supplement*, **67**, 11–18.
- Bambakidis T. (2009) Changes in benthic algal community structure following an unpredictable stream-wide desiccation event, Master of Science (MS), Bowling Green State University, Biological Sciences.
- Benenati P.L., Shannon J.P. & Blinn D.W. (1998) Desiccation and recolonization of phytobenthos in a regulated desert river: Colorado River at Lees Ferry, Arizona, USA. *Regulated Rivers: Research & Management*, **14**, 519–532.
- Boulêtreau S., Garabétian F., Sauvage S. & Sánchez-Pérez J.-M. (2006) Assessing the importance of a self-generated detachment process in river biofilm models. *Freshwater Biology*, **51**, 901–912.
- Coste M. & Ector L. (2000) Diatomées invasives exotiques ou rares en France: principales observations effectuées au cours des dernières décennies. *Systematics and Geography of Plants*, **70**, 373–400.
- Dorigo U., Berard A., Rimet F., Bouchez A. & Montuelle B. (2010) *In situ* assessment of periphyton recovery in a river contaminated by pesticides. *Aquatic Toxicology*, **98**, 396–406.
- Duong T.T., Morin S., Herlory O., Feurtet-Mazel A., Coste M. & Boudou A. (2008) Seasonal effects of cadmium accumulation in periphytic diatom communities of freshwater biofilms. *Aquatic Toxicology*, **90**, 19–28.
- Estes A. & Dute R.R. (1994) Valve abnormalities in diatom clones maintained in long-term culture. *Diatom Research*, **9**, 249–258.
- Falasco E., Bona F., Badino G., Hoffmann L. & Ector L. (2009) Diatom teratological forms and environmental alterations: a review. *Hydrobiologia*, **623**, 1–35.
- Friberg N., Bonada N., Bradley D.C., Dunbar M.J., Edwards F.K., Grey J. *et al.* (2011) Biomonitoring of human impacts in freshwater ecosystems: The Good, the Bad and the Ugly. In: *Advances in Ecological Research* (Ed W. Guy), pp. 1–68. Academic Press, Amsterdam.
- Iserentant R. & Blancke D. (1986) A transplantation experiment in running water to measure the response rate of diatoms to changes in water quality. In: *Proceedings of the Eighth International Diatom Symposium* (Ed M. Ricard), pp. 347–354. Koeltz Scientific Books, Koenigstein.
- Ivorra N., Hettelaar J., Tubbing G.M.J., Kraak M.H.S., Sabater S. & Admiraal W. (1999) Translocation of microbenthic algal assemblages used for *in situ* analysis of metal pollution in rivers. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **37**, 19–28.
- Keller R.P. & Lodge D.M. (2009) Invasive Species. In: *Encyclopedia of Inland Waters* (Ed G.E. Likens), pp. 92–99. Academic Press, Oxford.
- Krammer K. & Lange-Bertalot H. (1986–1991) *Bacillariophyceae* 1. Teil: Naviculaceae, 876 p.; 2. Teil: Bacillariaceae, Epithemiaceae, Surirellaceae, 596 p.; 3. Teil: Centrales, Fragilariaceae, Eunotiaceae, 576 p.; 4. Teil: Achnanthaceae. *Kritische Ergänzungen zu Navicula (Lineolatae) und Gomphonema*. 437 p., G. Fischer Verlag, Stuttgart.
- Lambert A.-S., Morin S., Artigas J., Volat B., Coquery M., Neyra M. *et al.* (2012) Structural and functional recovery of microbial biofilms after a decrease in copper exposure: Influence of the presence of pristine communities. *Aquatic Toxicology*, **109**, 118–126.
- McCormick P.V. & Stevenson R.J. (1991) Mechanisms of benthic algal succession in lotic environments. *Ecology*, **72**, 1835–1848.
- Medley C.N. & Clements W.H. (1998) Responses of diatom communities to heavy metals in streams: The influence of longitudinal variation. *Ecological Applications*, **8**, 631–644.
- Montuelle B., Dorigo U., Bérard A., Volat B., Bouchez A., Tlili A. *et al.* (2010) The periphyton as a multimetric bioindicator for assessing the impact of land use on rivers: an overview of the Ardières-Morcille experimental watershed (France). *Hydrobiologia*, **657**, 1–19.
- Morin S., Cordonier A., Lavoie I., Arini A., Blanco S., Duong T.T. *et al.* (2012) Consistency in diatom response to metal-contaminated environments. In: *Handbook of Environmental Chemistry* (Eds H. Guasch, A. Ginebreda & A. Geislinger), pp. 117–146, Vol. Emerging and Priority Pollutants in Rivers. Springer, Heidelberg.
- Morin S., Coste M. & Delmas F. (2008a) A comparison of specific growth rates of periphytic diatoms of varying cell

- size under laboratory and field conditions. *Hydrobiologia*, **614**, 285–297.
- Morin S., Coste M. & Delmas F. (2008b) From field studies to laboratory experiments for assessing the influence of metal contamination on relative specific growth rates of periphytic diatoms. In: *Heavy Metal Pollution*. (Eds. S.E. Brown, W.C. Welton), pp. 137–155. Nova Science, New York.
- Morin S., Pesce S., Tlili A., Coste M. & Montuelle B. (2010a) Recovery potential of periphytic communities in a river impacted by a vineyard watershed. *Ecological Indicators*, **10**, 419–426.
- Morin S., Proia L., Ricart M., Bonnineau C., Geiszinger A., Ricciardi F. *et al.* (2010b) Effects of a bactericide on the structure and survival of benthic diatom communities. *Vie et Milieu (Life and Environment)*, **60**, 109–116.
- Peterson C.G. (1996) Mechanisms of lotic microalgal colonization following space-clearing disturbances acting at different spatial scales. *Oikos*, **77**, 417–435.
- Peterson C.G., Hoagland K.D. & Stevenson R.J. (1990) Timing of wave disturbance and the resistance and recovery of a freshwater epilithic microalgal community. *Journal of the North American Benthological Society*, **9**, 54–67.
- Peterson C.G. & Stevenson R.J. (1992) Resistance and resilience of lotic algal communities: Importance of disturbance timing and current. *Ecology*, **73**, 1445–1461.
- Rolland T., Fayolle S., Cazaubon A. & Pagnetti S. (1997) Methodical approach to distribution of epilithic and drifting algae communities in a French subalpine river: Inferences on water quality assessment. *Aquatic Sciences - Research Across Boundaries*, **59**, 57–73.
- Rotter S., Sans-Piché F., Streck G., Altenburger R. & Schmitt-Jansen M. (2011) Active bio-monitoring of contamination in aquatic systems—An in situ translocation experiment applying the PICT concept. *Aquatic Toxicology*, **101**, 228–236.
- Roubeix V., Mazzella N., Schouler L., Fauvelle V., Morin S., Coste M. *et al.* (2011) Variations of periphytic diatom sensitivity to the herbicide diuron and relation to species distribution in a contamination gradient: implications for biomonitoring. *Journal of Environmental Monitoring*, **13**, 1768–1774.
- Sabater S. (2009) Diatoms. In: *Encyclopedia of Inland Waters*. (Ed G.E. Likens), pp. 149–156. Elsevier, Oxford.
- Schmid A.M.M. (1984) Wall morphogenesis in *Thalassiosira eccentrica*: comparison of auxospore formation and the effect of MT-inhibitors. In: *Proceedings of the 7th International Diatom Symposium*. (Eds. D.G. Mann), pp. 47–70. Koeltz, Koenigstein.
- Serra A. & Guasch H. (2009) Effects of chronic copper exposure on fluvial systems: Linking structural and physiological changes of fluvial biofilms with the in-stream copper retention. *Science of the Total Environment*, **407**, 5274–5282.
- Stevenson R.J. (1983) Effects of current and conditions simulating autogenically changing microhabitats on benthic diatom immigration. *Ecology*, **64**, 1514–1524.
- Stevenson R.J. (1990) Benthic algal community dynamics in a stream during and after a spate. *Journal of the North American Benthological Society*, **9**, 277–288.
- Stevenson R.J., Bothwell M.L. & Lowe R.L. (1996) *Algal ecology: Freshwater benthic ecosystems*. Academic Press, Inc., San Diego, CA.
- Stevenson R.J. & Peterson C.G. (1989) Variation in benthic diatom (Bacillariophyceae) immigration with habitat characteristics and cell morphology. *Journal of Phycology*, **25**, 120–129.
- Stevenson R.J. & Peterson C.G. (1991) Emigration and immigration can be important determinants of benthic diatom assemblages in streams. *Freshwater Biology*, **26**, 279–294.
- Tlili A., Bérard A., Roulier J.-L., Volat B. & Montuelle B. (2010) PO₄³⁻ dependence of the tolerance of autotrophic and heterotrophic biofilm communities to copper and diuron. *Aquatic Toxicology*, **98**, 165–177.
- Tolcach E.R. & Gómez N. (2002) The effect of translocation of microbenthic communities in a polluted lowland stream. *Verhandlungen Internationale Vereinigung Limnologie*, **28**, 254–258.
- Torgan L.C., Vieira A.A.H., Girollo D. & dos Santos C.B. (2006) Morphological irregularity and small cell size in *Thalassiosira duostra* maintained in culture. In: *Proceedings of the 18th International Diatom Symposium*. (Eds. A. Witkowski), pp. 407–416. Biopress Ltd., Bristol, UK.
- Verb R.G. & Vis M.L. (2005) Periphyton assemblages as bioindicators of mine-drainage in unglaciated western allegheny plateau lotic systems. *Water, Air, and Soil Pollution*, **161**, 227–265.
- Wenger E. (2002) Guidelines for the constitution of ecological river networks. In: *Nature and Environment Series*, no. 129. (Eds Council of Europe), pp. 40. Council of Europe publishing, Strasbourg.
- Wood A.M., Everroad R.C. & Wingard L.M. (2005) Measuring growth rates in microalgal cultures. In: *Algal Culturing Techniques*. (Ed R.A. Anderson), pp. 269–285. Phycological Society of America, Burlington.

(Manuscript accepted 15 May 2012)



The effect of temperature and a herbicide mixture on freshwater periphytic algae



Floriane Larras^{a,*}, Anne-Sophie Lambert^{a,b}, Stéphane Pesce^b, Frédéric Rimet^a,
Agnès Bouchez^a, Bernard Montuelle^a

^a Institut National de la Recherche Agronomique, UMR 0042 Carrtel, Thonon, France

^b Irstea UR MALY, 5 rue de la Doua, CS 70077, 69626 Villeurbanne Cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 May 2013

Received in revised form

3 September 2013

Accepted 4 September 2013

Available online 9 October 2013

Keywords:

Temperature

Herbicides

Mixture

Periphytic algae

ABSTRACT

Temperature is a strong driver of biofilm formation and of the dynamics of microalgae in freshwater. Moreover, exposure to herbicides is a well-known stressor of periphytic communities in anthropized aquatic environments. We tested these two environmental factors on periphytic communities that had been sampled from the littoral zone of Lake Geneva and acclimatized in the lab for 3 weeks at 18, 21, 24 and 28 °C. After this acclimation period, differences in the composition of the diatom community and decreases in cell density were observed corresponding to the temperature gradient. These acclimated communities were then exposed to 23 and 140 nM of a mixture composed of equitoxic quantities of atrazine, terbuthryn, diuron and isoproturon. The periphytic community was more sensitive to the herbicide mixture at 18 °C than at higher temperatures, suggesting that higher temperature reduced its toxicity. Small and pioneer diatom species known to be promoted by contamination also appeared to benefit from higher temperatures. Temperature therefore appears to condition the herbicide sensitivity of periphytic communities.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

In aquatic ecosystems, temperature is one of the main environmental factors regulating enzymatic activities and, consequently, many physiological and biogeochemical processes. Periphytic communities that develop in shallow aquatic zones serve crucial ecological functions and often experience marked temperature variations. Temperature influences the major functions of these communities, such as photosynthesis and respiration (Hancke and Glud, 2004; Baulch et al., 2005), enzymatic activity (Boulêtreau et al., 2012; Bonet et al., 2013) and biofilm formation (Rao, 2010; Villanueva et al., 2011; review by Pesce et al. (2012)). It has been demonstrated that lowering the temperature reduces the rate of uptake of nitrogen by microalgae (Reay et al., 1999), which may in turn affect the biogeochemical N cycle and photosynthesis. In a review, Davison (1991) pointed out that photosynthesis tends to be stimulated in microalgae by increases in temperature, as shown by the Q10 common value of 2. Microalgae can adapt their photosynthesis to temperature by adjusting their chlorophyll (chl) *a* content (DeNicola, 1996); however, temperature can also alter other functions linked to photosynthesis, such as electron

flux and plastoquinone diffusion (Davison, 1991). Many authors have observed that pigment concentrations are influenced by temperature, but inconsistent results are reported in the literature. Results are species-specific, and different authors have reported increases (Van der Grinten et al., 2005; Chalifour and Juneau, 2011) or decreases (Chalifour and Juneau, 2011) in the pigment content depending on the temperature range tested. In this context, El-Sabaawi and Harrison (2006) observed no linear correlation between increasing temperature and the chl content for the diatom *Pseudo-nitzschia granii*. Temperature can indeed modify species growth rate (Coles and Jones, 2000; Butterwick et al., 2005; Chalifour and Juneau, 2011), but that depends on the intrinsic properties of the species and the prevailing temperature during their evolution in their respective biogeographical regions (Souffreau et al., 2013). At the community level, temperature has a major influence on community composition. The dominance of a particular class of algae is primarily dependent on its optimum temperature. As a general trend, and regardless of any other environmental parameter, diatoms are classified as cool-season species and tend to be dominant at temperatures below 20 °C, whereas cyanobacteria are more characteristic of warmer temperatures (reviewed in DeNicola, 1996; Butterwick et al., 2005; Van der Grinten et al., 2005).

Anthropic factors, such as pesticide contamination, also influence the development of periphytic communities. Photosystem II inhibitor

* Corresponding author. Fax: +33 4 50 26 07 60.

E-mail address: floriane.larras@thonon.inra.fr (F. Larras).

(PSII) herbicides are often found in diverse aquatic environments and occur mainly in mixtures (Gilliom, 2007; Schuler and Rand, 2008; Loos et al., 2009). Herbicides such as atrazine, terbutryn, diuron and isoproturon are frequently detected in Lake Geneva (Ortelli et al., 2012), at concentrations below the Water Framework Directive regulatory thresholds. These herbicides are mainly used in the context of agricultural and peri-urban activities, and the released fraction of these herbicides is carried into the aquatic environment through runoff, depending on many parameters such as the chemical properties of the herbicides, meteorological events, watershed structure and soil composition (Blanchoud et al., 2007; Ulrich et al., 2013). Microalgae living in the biofilm are known to be sensitive to PSII inhibitor herbicides, which inhibit photosynthesis by preventing electron transport in the photosynthesis electron transport chain. Many authors have observed that these substances display toxicity towards autotrophic organisms at low concentrations (reviewed by Pesce et al., 2011), either individually (Bérard et al., 1999; Debenest et al., 2010; Seguin et al., 2001; Roubeix et al., 2011; Larras et al., 2012) or in mixtures (Pesce et al., 2010; Knauert et al., 2008; Knauert et al., 2009; Porsbring et al., 2010). Because periphytic communities are often constrained by temperature and herbicide contamination, the interaction (synergy or antagonism) between these two stressors and their resulting biological effect is of interest. Most studies have reported the temperature dependent sensitivity of organisms to herbicides at the species level. The influence of temperature acclimation on sensitivity of microalgae to chemicals such as pesticides (Bérard et al., 1999; Chalifour and Juneau, 2011) and heavy metals (Cairns et al., 1978; Wang and Wang, 2008) varies considerably between studies. For example, Chalifour and Juneau (2011) observed that the sensitivity of *Scenedesmus obliquus* and two strains of *Microcystis aeruginosa* to atrazine was higher when they were acclimated to 10 °C instead of 25 °C, whereas that of *Navicula pelliculosa* was not affected by temperature. Cairns et al. (1978) also observed a different pattern of sensitivity to atrazine in various microalgae. It therefore appears that the influence of temperature on microalgal sensitivity to chemicals varies greatly at the species level. There is a clear lack of knowledge, however, about the influence of temperature alone on the response of biofilms to chemicals at the community level. One of the studies investigating such interactions was performed by Boivin et al. (2005), who observed that bacterial communities were more resistant to copper at 20 °C than at 10 °C or 14 °C. They concluded that temperature can alter both the exposure to copper and its toxic effects. This makes it particularly interesting to perform such studies with phototrophic communities.

As temperature influences both the physiological and structural parameters of periphytic communities and herbicide toxicity, we can expect to observe various responses in the Lake Geneva algal communities to temperature and contamination. We also expect to find that high temperature and high herbicide concentrations have cumulative effects. Accordingly, we investigated how different temperatures influence (a) the structure and function of a natural periphytic microalgal community and (b) the sensitivity of these communities to a herbicide mixture composed of atrazine, terbutryn, diuron and isoproturon. Microcosms were inoculated with a natural periphytic community. After growing for 3 weeks at 18, 21, 24 or 28 °C, temperature-acclimated sub-samples were exposed to two concentrations (23 or 140 nM, the low and high levels, respectively) of an equitoxic mixture of the four herbicides and maintained at their growth temperature. These two concentrations were selected based on their toxicity toward benthic diatoms, previously demonstrated by single-species laboratory bioassays (Larras et al., 2013) carried out at 21 ± 2 °C. We expected to find that the concentrations would display different levels of toxicity, but that neither would completely inhibit the parameters investigated. The impact of these conditions on the functional and structural parameters of these periphytic microalgal communities

was evaluated by assessing the diatom community structure and composition before and after (4 days) contamination. We focused mainly on diatoms because they make up most of the biomass of such communities.

2. Material and methods

2.1. Experimental setup

These experiments were carried out in 36 aquariums ($15 \times 15 \times 15$ cm³) divided into four groups of nine aquariums each. Each group was grown in a water-bath maintained at 18, 21, 24 and 28 °C. Five racks containing four glass slides (10×2 cm²) each were placed in each aquarium to allow biofilm growth to occur. The day before incubation began, water was sampled from the littoral zone of Lake Geneva and stabilized overnight in cans at each of the selected temperatures. The periphytic community was scraped from various rocks in the littoral zone of Lake Geneva from early to late May 2012, at the INRA station (46°22'5.78"N, 6°27'15.04"E). The periphytic inoculum was retrieved in a 1 L glass recipient, and then equal amounts were added to each of the 36 aquariums. To prevent nutrient deficiency and to maintain representative environmental conditions, the aquariums were filled with freshwater from the littoral zone of Lake Geneva twice a week during the 3 weeks of acclimation; fresh natural inoculum was also added to each aquarium to enhance colonization of the glass slide. The 3-week acclimation period was chosen so that we would be working at the end of the biofilm growth phase, in order to avoid any detachment of the biofilm from the substratum and to ensure greater diversity. The periphytic community was grown for 3 weeks at 18, 21, 24 or 28 °C with a light average of $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and a 14:10 h light:dark cycle with a light system composed of two neon GroLux 36 W (Sylvania, Germany) and two Solar Natur 36 W (JBL, Germany) lamps per water bath. The water temperature in the littoral zone of Lake Geneva during the sampling period was 16.4 ± 0.70 °C. There was a difference of approximately 2 °C for the lowest temperature tested, indicating that the 18 °C samples were in fact the reference for this experiment. The physico-chemical conditions were assessed twice a week during the incubation and contamination phases. Previous herbicide screening had revealed that there was no significant contamination of such chemicals at the sampling point.

2.2. Microcosm contamination

Diuron (purity 99.5 percent), isoproturon (purity 99.9 percent), atrazine (purity 99.9 percent) and terbutryn (purity 99.3 percent) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO 63103, USA) and stock solutions were prepared in water from Geneva Lake that had been filtered at 0.22 μm . We used species sensitivity distribution (SSD), based on benthic diatom sensitivity data (Larras et al., 2013), to derive an HC50 value (Hazardous Concentration that protects 50 percent of species of a community, a less variable value) for each herbicide. From these HC50 thresholds, we determined the proportion of each herbicide required for the mixture, so that each of them would theoretically have the same effect on the community of benthic microalgae (this is known as an equitoxic mixture). The two mixture concentrations contained similar proportions of herbicides and were composed of 63 percent of atrazine, 3 percent of terbutryn, 7 percent of diuron and 27 percent of isoproturon.

After growing for 3 weeks in thermo-regulated water-baths, we contaminated three aquariums with the 23 nM mixture (the low concentration or L), three aquariums with the 140 nM mixture (the high concentration or H) and three aquariums were filled with clean filtered water (0.22 μm , Millipore) taken from Lake Geneva (control treatment, C). The nominal concentrations of each herbicide in the L and H mixtures were 14 and 88 nM of atrazine, 0.7 and 4.2 nM of terbutryn, 1.6 and 10 nM of diuron and 6.2 and 38 nM of isoproturon, respectively. Periphytic communities were exposed for 4 days, as in standard ecotoxicological bioassays (ASTM International, 2007), under the same conditions as had been used for preliminary growth.

2.3. Herbicide analysis

The herbicide concentrations were assessed for each treatment 6 h after contamination, to assess the true exposure concentration faced by the biofilm, after the first adsorption process had occurred. Concentrations were measured using a multidetection analysis system including gas (GC/MS) and liquid chromatography (HPLC/MS/MS). Analyses were processed by the "Laboratoire Départemental d'Analyses de la Drôme" (www.lida26.com). The quantification limits were 0.093 nM, 0.086 nM, 0.097 nM and 0.17 nM for atrazine, diuron, isoproturon and terbutryn, respectively.

2.4. Physical and chemical analyses

Nutrient concentrations in the water (NH_4 , NO_2 , NO_3 , PO_4 , SiO_2 and COD) were assessed following the relevant AFNOR standards. Measurements were taken 2 times per week throughout the 3 weeks of the growth phase, and at t0 and t4, just before changing the water. Conductivity and pH were measured simultaneously using an Orion 5 stars probe (Thermo Scientific, USA). Light and temperature were also assessed throughout the experiment using Hobo[®] data loggers (PROSENSOR, Amanvillers, France).

2.5. Characterization of the microalgal community

2.5.1. Structure of the benthic diatom community

The taxonomic determination of the diatoms in the 36 samples was performed according to the European Committee for Standardization (EN 14407) before contamination (t0) and at the end of the experiment, 4 days after contamination (t4). At each time point, two glass slides were taken from each aquarium. The biofilm was removed from the glass slides with a razor blade and then boiled in HNO_3 at 70 °C until the solution was colorless. The pellets were then washed twice with distilled water, and 300 μL was transferred to coverslips. After drying, the coverslips were affixed to a glass slide with warm Naphrax (high refractive index medium, Brunel Microscopes, Ltd., UK). Diatom species were identified optically at a magnification of $1000\times$ from 400 valves, based on their siliceous skeleton. The diatom cell density was assessed directly from the boiled samples by an optical count with a Malassez cell.

2.5.2. Photosynthetic parameter

Two glass slides were taken from each of the 36 aquariums at t0 and t4. Biofilm was removed from the slides with a razor blade and kept for 30 min in the dark. Both the maximum PSII quantum yield of the whole community and the concentration of total chlorophyll (chl) were assessed for each of the 36 samples using a PhytoPAM (pulse amplitude-modulated, H. Walz). The chl concentration was assessed for the whole community and for each algal class (diatoms, cyanobacteria, chlorophytes) individually. For the diatoms, the chl content per cell was assessed from the measured chl content attributed to diatoms divided by the Malassez cell diatom cell count.

2.6. Data analysis

The statistical analyses were performed with R software. To test whether the effects of temperature and/or herbicide were significant on the chl content, maximum PSII quantum yield, cell density or the Shannon–Weaver index, we first tested for normality and homoscedasticity. Then we performed parametric analyses with an ANOVA and Tukey post-hoc or non-parametric analysis with a Wilcoxon–Mann–Whitney test followed by a Kruskal–Wallis test. To test whether there was any significant effect on diversity, a MANOVA was carried out using PC-ORD software on the basis of the abundance of the ten most abundant diatom species of the community, which represent at least 1 percent of the total diversity, and another group consisting of the 22 least abundant species. Principal component analysis (PCA) was performed using R software with the “FactoMineR” package. The Q10 for chl and cell density was defined as the value of each endpoint at 28 °C divided by the value of each endpoint at 18 °C for each of the C, L and H treatments.

3. Results

3.1. Physico-chemical conditions

During the 3 weeks of colonization, the physico-chemical parameters remained stable for each of the temperatures tested. The temperatures measured were close to those targeted, but were slightly higher, with an average of 18.6, 21.4, 24.7 and 28.2 °C during incubation (Table 1). A low concentration of phosphorus (10 $\mu\text{g/L}$) was reached in the water just after sampling the coastal zone. As a general trend, NH_4 , NO_2 , NO_3 and SiO_2 concentrations increased with temperature during colonization. This difference was significant between 18 and 24 °C for NH_4 , NO_2 and NO_3 (p -values: 0.03, 0.02 and 0.04 respectively) and between 18 and 28 °C for NH_4 , NO_2 , NO_3 and SiO_2 (p -values: 0.026, 0.046, 0.04 and 0.002 respectively). No significant difference was observed between treatments for the pH, conductivity, or COD.

After 4 days of exposure, the nutrient concentrations had changed in response to the different levels of herbicides, depending on

Table 1

Means and standard deviation of physical and chemical parameters during the 3 weeks of colonization for each temperature ($n=6$).

Parameters	Treatments			
	18 °C	21 °C	24 °C	28 °C
Temperature (°C)	18.6 ± 0.4	21.4 ± 0.4	24.7 ± 0.2	28.2 ± 0.4
Light ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	39 ± 5.4	38 ± 4.4	41 ± 2.2	41 ± 2.3
pH	8.98 ± 0.24	8.89 ± 0.15	8.81 ± 0.09	8.71 ± 0.08
Conductivity ($\mu\text{S/cm}^{-1}$)	263 ± 13	276 ± 6	291 ± 8.4	313 ± 11
NH_4 ($\mu\text{g N/L}$)	62 ± 29	72 ± 31	145 ± 77	177 ± 91
NO_2 ($\mu\text{g N/L}$)	6 ± 3	8 ± 3	15 ± 7	32 ± 4
NO_3 ($\mu\text{g N/L}$)	236 ± 104	283 ± 79	427 ± 99	474 ± 181
PO_4 ($\mu\text{g P/L}$)	6 ± 4	5 ± 2	5 ± 2	4 ± 1
COD (mg C/L)	2.90 ± 0.75	2.90 ± 1.2	2.25 ± 0.34	2.25 ± 0.28
SiO_2 (mg/L)	0.26 ± 0.17	0.35 ± 0.13	0.42 ± 0.17	1.14 ± 0.36

temperature (Table 2). At 18, 21 and 24 °C, concentrations of NH_4 , NO_2 and NO_3 tended to be markedly higher for the H treatments than for the C treatments. Conversely, a slight decrease in NO_3 was observed for the H treatment compared to the C and L treatments at 28 °C. At 18 °C, NH_4 , NO_2 and NO_3 levels were 64, 3, and 160 $\mu\text{g/L}$ for the C treatments and 259, 10 and 300 $\mu\text{g/L}$, respectively, for the H treatments. The same trend was observed for SiO_2 at each temperature.

The herbicide concentrations measured at the beginning of the contamination were similar for the different temperatures for a given treatment (Table 2). The concentrations measured were close to the nominal concentrations, especially for atrazine, terbutryn and isoproturon, where the concentrations were mainly between –5 and –25 percent of the nominal concentration (except at 28 °C-H/terbutryn (–52 percent)) (Table 2).

3.2. Changes in functional parameters

Temperature significantly affected the total chl content of the community at t0 and t4 (p -values: 8.24E–05 and 2.37E–08, respectively, Table 3). With the C treatments, the chl concentration decreased with increasing temperature, and significant differences were observed between the 18 and the 21, 24 and 28 °C samples (Fig. 1a). After 4 days of exposure, the herbicide mixture significantly affected the total chl content (p -value: 1.57E–06, Table 3), but there was no interaction with temperature. A significant difference in chl concentration, due to herbicide contamination, was observed at 18 °C between C and both L and H treatments, and at 24 °C between the C and H treatments only. The maximum PSII quantum yield was not significantly affected by temperature or herbicide (Table 3, Fig. 1b). The Q10s obtained for the chl concentration were 0.17, 0.19 and 0.29 for the C, L and H treatments, respectively. Thus, the chl concentration tended to decrease when the temperature increased from 18 °C to 28 °C.

3.3. Changes in structural parameters

At t0, cell density was not significantly affected by temperature (Table 3). However, herbicides and temperature both significantly affected the cell density at t4 (p -value: 0.009 and 0.001, respectively, Table 3 and Fig. 1c). The cell density decreased with increasing temperature, and a significant difference was observed between 18 and 24 °C for the C treatments only, and between 18 and 28 °C for the C, L and H treatments. The significant difference for C treatments between 18 and both 24 and 28 °C samples highlights the fact that there is a temperature above 21 °C that has a major effect on the cell density of diatoms. After 4 days of exposure, there was only a significant difference between the C and H treatments at 18 °C. For the same herbicide treatment, the

Table 2

Herbicides concentration (in nM) at the beginning of the contamination and chemical conditions at the end of the 4 days of herbicide exposure for each contamination level: C (control), L (low) and H (high) and at each temperature, in the water phase.

	Treatments											
	18 °C			21 °C			24 °C			28 °C		
	C	L	H	C	L	H	C	L	H	C	L	H
Herbicides (nM)												
Atrazine	–	12	67	–	12	75	–	11	80	–	13	94
Terbutryn	–	0.7	2.98	–	0.5	3	–	0.5	3	–	0.6	2
Diuron	–	1	8	–	0.8	4	–	1	6	–	1	5
Isoproturon	–	5	37	–	4	42	–	5	35	–	7	41
Total mixture concentration	–	19	113	–	17	124	–	18	124	–	22	142
Parameters												
NH ₄ (μg N/L)	64	103	259	53	73	199	78	118	275	106	158	203
NO ₂ (μg N/L)	3	4	10	6	8	13	13	15	27	75	91	98
NO ₃ (μg N/L)	160	180	300	210	270	370	330	450	500	610	640	570
PO ₄ (μg/L)	3	4	4	3	3	3	2	4	3	2	3	3
COD (mg C/L)	2.52	2.31	2.36	1.63	1.96	1.83	1.94	1.86	1.78	1.7	1.87	1.79
SiO ₂ (mg/L)	0.21	0.27	0.3	0.14	0.3	0.57	0.16	0.41	0.44	0.38	0.71	0.83

Table 3

Results of statistical analysis based on functional parameters of the periphytic communities and structural parameters of diatom communities at the beginning (t0) and at the end of the experiment (t4). Both statistical analyses, for diatom diversity, were carried out on the ten most abundant diatoms species. 2-way ANOVA tests were carried out. The *p*-values are given as n.s.; *p* > 0.05; **p* ≤ 0.05; ***p* ≤ 0.01; ****p* ≤ 0.001.

Parameters	Source	t0	t4
		<i>p</i> -Value	<i>p</i> -Value
Chlorophyll content	Herbicide mix	n.s.	***
	Temperature	***	***
	Herbicide mix × Temperature	n.s.	n.s.
Maximum quantum yield	Herbicide mix	n.s.	n.s.
	Temperature	n.s.	n.s.
	Herbicide mix × Temperature	n.s.	n.s.
Cellular density	Herbicide mix	n.s.	**
	Temperature	n.s.	***
	Herbicide mix × Temperature	n.s.	n.s.
Diversity (Shannon–Weaver)	Herbicide mix	n.s.	*
	Temperature	n.s.	n.s.
	Herbicide mix × Temperature	n.s.	n.s.
Diversity (MANOVA)	Herbicide mix	n.s.	*
	Temperature	*	**
	Herbicide mix × Temperature	n.s.	n.s.

chl content per cell remained similar at the different temperatures, and no clear trend could be discerned (Fig. 1d). However, at 21 °C, this parameter was lower irrespective of the herbicide treatment used due to the high cell density and the low chl content measured. The Q10s obtained for cell density were 0.16, 0.31 and 0.26 for the C, L and H treatments, respectively, meaning that the cell density tended to decrease with increasing temperature from 10 °C to 18 °C, especially with the C treatment.

Regarding the community composition, the Phyto-PAM signal revealed that a significantly higher (*p*-values < 0.05) proportion of chl originated from diatoms than from cyanobacteria whatever the level of contamination and temperature (Fig. 1a). No signal from chlorophytes was detected. With regard to the diatom community composition, MANOVA analysis demonstrated that temperature had a significant effect at t0 and t4 (*p*-values: 0.03 and 0.01, respectively, Table 3), and that herbicide contamination also

had a significant effect at t4 (*p*-values: 0.04, Table 3), but no significant interaction was observed at t4. A total of 32 species were identified in these samples including ten species that represented at least 1 percent of the total diversity (*Achnanthes minutissimum*, *Nitzschia fonticola*, *Gomphonema pumilum*, *Navicula cryptotenella*, *Cyclotella costei*, *Cymbella excisa*, *Amphora pediculus*, *Nitzschia lacuum*, *Encyonema minutum* and *Encyonopsis minuta*). The other 22 species (that represented individually less than 1 percent of the total diversity) constituted a group of less abundant species.

The analysis of the diatoms' relative abundance evolution was based on the seven most abundant diatoms and on a group containing all the other species (i.e. the other three most abundant species plus the 22 species with a relative abundance of less than 1 percent each) (Fig. 2). At the end of the contamination period, all the C, L and H treatments of the 24 and 28 °C samples, but only the contaminated samples at 18 °C and 21 °C, were characterized by a higher proportion of *A. minutissimum*. The relative abundance of *N. fonticola* appeared to be affected more by temperature than by herbicides, whereas the relative abundance of *E. minutum* appeared to be particularly affected by herbicides in the 18 and 21 °C samples. Higher temperatures and herbicide concentrations appeared to select for smaller species. The diatom diversity, estimated with the Shannon–Weaver Index, appeared to be significantly affected at t4 only by the herbicide mixture (*p*-value: 0.003, Table 3). However, in the control samples, we observed a non-significant decrease of the Shannon–Weaver Index between the 18 and 28 °C treatments (Fig. 1e). The Shannon–Weaver index between the C and H treatments fell significantly at t4 at 18 °C and non-significantly at 21 °C. No interactive effect was found between herbicides and temperatures for these parameters.

3.4. PCA of the structural and functional parameter

A PCA analysis was performed (Fig. 3a) on the cell density, the Shannon–Weaver index, the maximum quantum yield of the PSII and chl concentration. The first two axes explained 75 percent of the total variability. The distribution of the samples on axis 1 was mainly driven by the temperature and herbicide mixture concentration. This axis was positively correlated with diversity (Shannon–Weaver index) and chl concentration (Fig. 3b). From the PCA plot, we observed that C, L and H treatments at 28 °C were situated much closer to each other, whereas the C, L and H treatments at

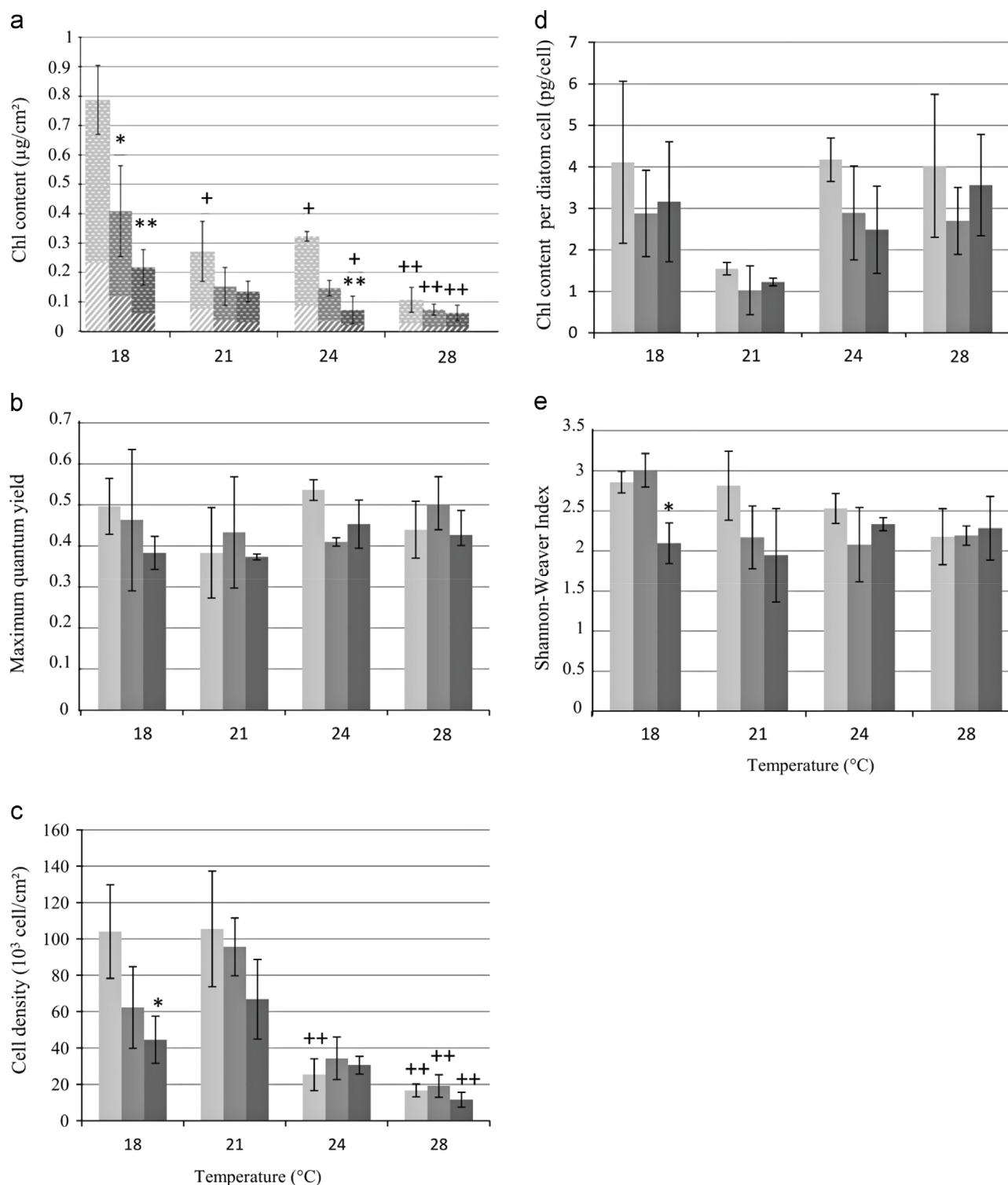


Fig. 1. Evolution of (a) chl concentration of diatoms and cyanobacteria, (b) maximum PSII quantum yield of the whole communities, (c) diatoms' cellular density, (d) chl content per diatom cell (pg/cell) and (e) diatoms' diversity (Shannon-Weaver index) under different temperature growths and herbicide concentrations, after 4 days of exposure. Clear gray, dark gray and black represent C, L and H treatments, respectively. $n=3$; * and ** represent the significant difference (ANOVA) of L and H treatments compared to C within a same temperature (respectively, p -value < 0.05 and < 0.01); + and ++ represent the significant difference between a treatment at 18°C compared to the same treatment under another temperature (respectively, p -value < 0.05 and < 0.01). In graph (a), dots and stripes represent diatoms and cyanobacteria chl proportion, respectively.

18°C were more widely spread out on the PCA plot. This highlights the fact that the parameters of the samples exposed to herbicides were more similar to the non-exposed samples at higher temperature than at lower temperature. There was a progressive

tendency from 18 to 28°C . At 28°C , the C and H samples were located together on the left-hand side of the PCA plot, whereas at 18°C , the C and H samples were on the right- and left-hand sides of the plot, respectively.

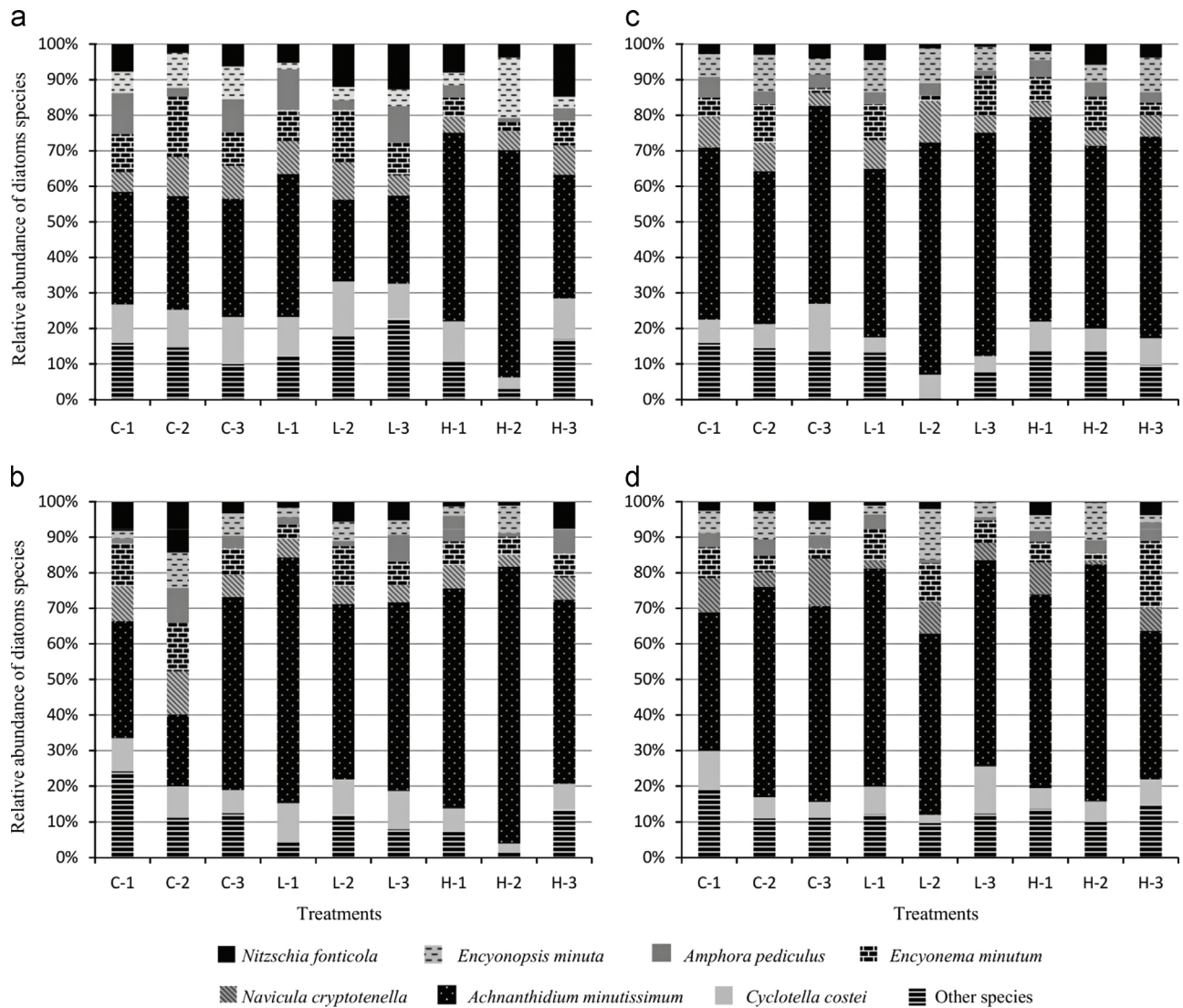


Fig. 2. Relative abundance of the 7 most abundant diatom species at (a) 18 °C, (b) 21 °C, (c) 24 °C and (d) 28 °C after 4 days of exposure for each replicate. C: Control, L: Low level, H: High level. 1, 2 and 3 represent the replicate number of the sample.

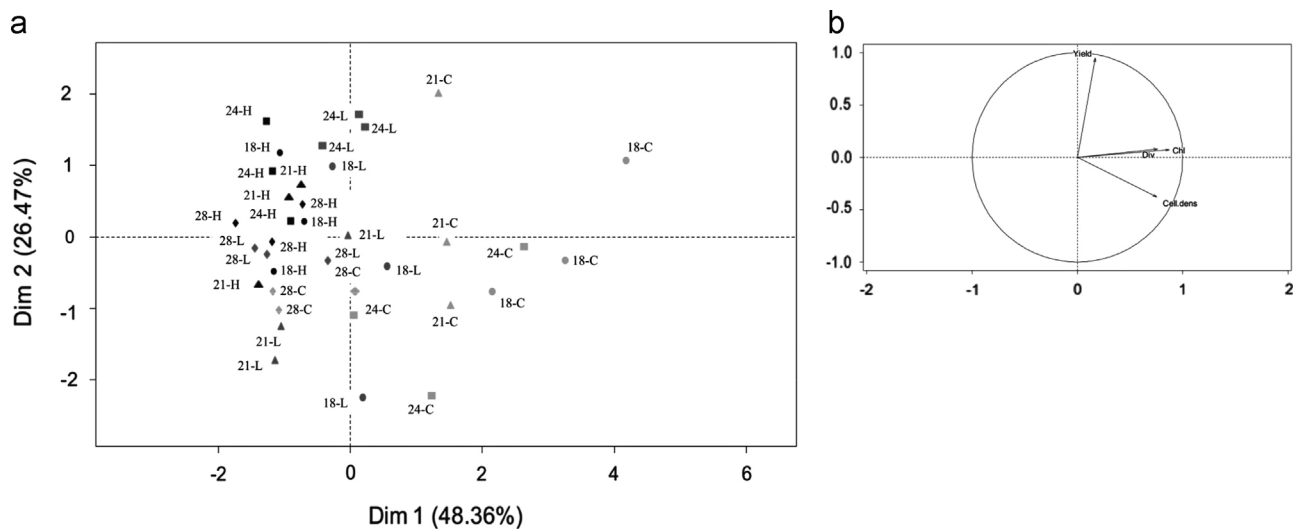


Fig. 3. Representation of (a) the principal component analysis (PCA) plot and (b) the spearman correlation circle. On graph (a), dots, triangles, squares and diamond represent temperatures of 18, 21, 24 and 28 °C, respectively, and clear gray, dark gray and black represent treatments C, L and H, respectively. On graph (b), Yield: maximum PSII quantum yield; Chl: chl content; Cell dens: cellular density; Div: Shannon–Weaver index.

4. Discussion

4.1. The influence of temperature on community development

Temperature is a crucial environmental factor that regulates many physiological and biochemical processes in microalgae. In the literature, the reported influence of temperature on microalgae has varied greatly, and the results reported are inconsistent. In the present study, periphytic communities were acclimatized to various temperatures for 3 weeks so that temperature could be considered to be an environmental factor rather than a stress factor. Acclimation enables communities to adapt to different temperatures by modifying their physiological responses (Davison, 1991; Staehr and Sand-Jensen, 2006). Davison (1991) reported in a review that the acclimation process starts within a few hours. In the literature, the acclimation times reported for microalgae vary considerably and in some cases last for many weeks (Boivin et al., 2005; Chalifour and Juneau, 2011) depending on the experiment and the species. In our experiment, there was a difference of approximately 2 °C between the lake water temperature during the sampling period and the lowest temperature used in the experiment. Moreover, we observed that the taxonomic composition of communities after growing for 3 weeks at 18 °C was similar to that found in situ in Lake Geneva during the experiment. This indicates that the 18 °C samples were in fact the reference samples for this experiment. Acclimated communities displayed specific structural responses. Significant differences were primarily observed between the 18 and 28 °C communities. Intermediate temperatures appeared to be “transitional”, and the extent to which communities exposed to these conditions were affected depended on the parameter being observed.

The influence of temperature on the chl content of microalgae has received substantial attention in the literature, and results differed significantly between studies, depending on the organisms and temperature ranges tested. For example, it has been reported that the chl *a* contents of several species, including *Merismopedia tenuissima*, *Oscillatoria* sp. (Coles and Jones, 2000) and *N. pelliculosa* (Chalifour and Juneau, 2011), were not significantly affected by temperature. Some authors have reported that chl *a* content may increase with temperature in *M. aeruginosa* (Coles and Jones, 2000; Chen et al., 2011), whereas others have shown that chl content was higher at lower temperatures in *S. obliquus* (Chalifour and Juneau, 2011) and *P. granii* (El-Sabaawi and Harrison, 2006). This was found particularly when the temperature was below the optimum temperature. Above all, the change in chl *a* content of cells with temperature appeared to depend on the species (Rhee and Gotham, 1981). This modification of the chl *a* content might be an adaptive process that supplies the energy needed for enzymatic respiratory activity, which is known to be highly sensitive to temperature (Davison 1991; reviewed in DeNicola (1996)). In our study, biomass decreased with increase in temperature. The inhibitory effect of increasing temperature (from 18 to 28 °C) on cell density and chl content on the diatom community was highlighted by the Q10 values observed for the controls. At both extreme temperatures, the ratio of chl content per diatom cell was constant over the range of temperatures evaluated in this study. In the light of the similar maximum PSII quantum yields observed at 18 and 28 °C, it appears as if cells tend to maintain a stable photosynthetic capacity over our temperature range (with a restriction at 21 °C).

The growth of diatoms was markedly affected by rising temperature, especially above 21 °C. This was not due to nutrient depletion, because higher levels of Si and Nitrogen were observed for the higher-temperature treatments during the acclimation period. Diatoms are defined as “cool-season” algae in many studies for their capacity to grow under low temperature (Cairns et al., 1978; Van der Grinten et al., 2005; Chalifour and Juneau, 2011). However, the

optimum temperature appeared to vary considerably between species (Admiraal, 1977; Coles and Jones, 2000; Butterwick et al., 2005; Van der Grinten et al., 2005) and even between strains of the same species depending on their historical growth conditions (Souffreau et al., 2013). In studies on *Pinnularia borealis* and *Hantzschia amphioxys* species, strains from Antarctica had lower optimum growth temperatures than the other lineages originating from different biogeographical locations (Souffreau et al., 2013). Staehr and Sand-Jensen (2006) observed an increase in growth, photosynthesis and respiration in phytoplanktonic algae in response to an increase in temperature to between 2 and 6 °C above the initial growth temperature. In the present study, the temperature of Lake Geneva water was about 16 °C at the beginning of the sampling period, and algal inocula had 3 weeks to acclimatize to the higher temperatures. However, the cell density of diatoms was severely affected at 24 °C, i.e. at 8 °C above the initial environmental temperature. This is consistent with the mean summer time temperature in the littoral zone of Lake Lemman, which rarely exceeds 22–23 °C (INRA, unpublished data).

In the present study, temperature also displayed a significant effect on the composition of diatom communities after acclimation. MANOVA analysis performed on the ten most abundant diatoms species revealed a robust, statistically significant effect. In other studies, temperatures above 30 °C favored several appropriately adapted species, especially blue and green algae, leading to a reduction in the diversity of the community (reviewed in DeNicola, 1996). When algae had evolved under competitive conditions, thermal optima and competitive behavior due to nutrient resources influenced the dominance of several species (Di Pippo et al., 2012; Van der Grinten et al., 2005). In the present study, the diatom community was mainly composed of pennate species irrespective of the temperature. A marked dominance of *A. minutissimum* was observed with increase in temperature. *A. minutissimum* is known to be sensitive to organic pollution, to be a highly competitive pioneer species and to be tolerant of low nutrient conditions (Rumeau and Coste, 1988; Biggs et al., 1998; Passy, 2008). Hence, we can suppose that *A. minutissimum* may more readily be found in oligotrophic systems during summer and at higher temperatures, when nutrients are being consumed by other planktonic algae. Consequently, it would seem that higher temperatures favor small, pioneering and highly competitive species. Stenger-Kovacs et al. (2006) found that the relative abundance of *A. minutissimum* was particularly high at the end of the summer and was highly dependent on the Si concentration in the water. Other species, such as *Nitzschia* spp. and *Cocconeis* spp., tend to be more abundant in water above 25 °C (DeNicola, 1996). In this study, the relative abundance of *N. fonticola* tended to decrease with increasing temperature, whereas the relative abundance of *N. lacuum* was more independent of temperature.

Hence, in our study, temperatures above the reference temperature (18 °C) reduced the total biomass (chl concentration and cell density) of communities, influenced the diatom community structure by selecting species with small cell and finally led to a decrease in diatom diversity.

4.2. Effect of herbicide mixtures and interactions with temperature

Owing to the release of various herbicides into the environment and their transfer into aquatic ecosystems, periphytic communities are mainly exposed to a mixture of PSII inhibitors (Loos et al., 2009; Ortell et al., 2012). Herbicides with this specific cellular target, such as atrazine, terbutryn, diuron and isoproturon, are known to affect benthic microalgae at low concentrations (Pérès et al., 1996; Guasch et al., 1997; Guasch and Sabater, 1998; Schmitt-Jansen and Altenburger, 2005; Magnusson et al., 2008; Debenest et al., 2009; Roubéix et al., 2011; Larras et al., 2012).

This sensitivity, however, appears to be influenced by environmental factors, such as temperature. In the context of triazine contamination, in many studies higher temperatures appear to tend to reduce triazine toxicity. Chalifour and Juneau (2011) observed that *S. obliquus* and both strains of *M. aeruginosa* became less sensitive to 0.1 μ M of atrazine along an increasing temperature gradient, ranging from 10 to 25 °C. Similarly, *Oscillatoria limnetica* appeared to be more sensitive to atrazine at a spring-like temperature (13 °C) than at a summer-like temperature (20 °C) (Bérard et al., 1999). This suggested that differences in sensitivity could be due to the rate of turnover of the D1 protein and, consequently, the recovery rate of PSII activity. Conversely, and for two marine flagellate species, the toxic effects of terbuthylazine on their biomass and growth tend to increase as temperature rises from 15 to 25 °C (Fiori et al., 2013). The authors suggest that the change of toxicity with temperature was dependent on the growth optimum temperature of the different species. In the literature, the effects of temperature on the sensitivity of organisms is not predictable since it varies dramatically depending on the chemicals, the temperature ranges studied and the organisms concerned (Cairns et al., 1978).

Our results showed that community sensitivity to herbicides mixture depended on the growth temperature. As a general trend, the higher the growth temperature, the lower the toxicity of the mixture, except for the maximum PSII quantum yield. This parameter was not significantly affected by temperature and herbicide exposure (despite a slight decrease at 18 and 24 °C between herbicide treatments). Moreover, at 21 °C, the maximum PSII quantum yield varied considerably between the herbicide treatments. Similarly, in a single-species experiment, the maximum PSII quantum yield of *N. pelliculosa* was not affected by temperature in the 10 °C to 25 °C range or by atrazine (Chalifour and Juneau, 2011). Structural parameters such as cell density and chl concentration were significantly affected by the mixture especially at 18 °C, and were non-significantly or not affected at all at higher temperatures (especially at 28 °C). The decrease in toxicity with increasing temperature may be related to several factors.

First, periphytic communities did not appear to be at a steady state at 28 °C, probably due to physiological changes. For example, given the higher levels of nutrients in water after the incubation period and in the contaminated samples, we suggest that nutrient metabolism was affected by both temperature and herbicides individually. Elsewhere, Tang et al. (1998) demonstrated that atrazine uptake by microalgae depends on their biovolume and suggested that bioconcentration might be a prerequisite for toxicity. In our experiments, the lower sensitivity of diatoms grown at higher temperatures may thus be due to the fact that these observed species were mainly small and may have taken up less and internalized smaller amounts of the herbicides. Previous studies highlighted a higher abundance of small diatoms species under an exposure of PSII inhibitor herbicides (reviewed in Debenest et al., 2010).

Second, many studies of natural algae communities have shown that abiotic parameters, such as temperature, nutrients or light, influence the community response of phytoplankton (Bérard et al., 1999; Bérard and Benninghoff, 2001) and periphyton (Guasch et al., 1997; Guasch and Sabater, 1998; Pesce et al., 2009; Roubéix et al., 2010; Villeneuve et al., 2011; Bonet et al., 2013) to chemicals stress. In our study, the highest temperatures (24 and 28 °C) influenced community composition and also led to a shift of species and to the dominance of the diatom *A. minutissimum*. We also observed that PSII inhibitors induced a shift in community composition at 18 and 21 °C, also leading to an increase in the dominance of *A. minutissimum*. Other studies have observed such effects in periphytic communities (Dorigo et al., 2004; Schmitt-Jansen and Altenburger, 2005; Roubéix et al., 2011) in response to PSII inhibitor exposure. In our experiment, we hypothesized that these high temperatures

initially selected first this particular species during the incubation period, and that the following contamination period had no further effect on diversity. As suggested by Vinebrooke et al. (2004) this finding indicates the co-tolerance of *A. minutissimum* to both temperature and herbicides. This co-tolerance may then explain why Q10 values for cell density and chl content increase slightly with herbicides contamination towards a value of 1 for these parameters (a value of 1 means that an increase of 10 °C has no effect on the parameter, in this case an increase from 18 to 28 °C).

5. Conclusion

This study shows that the structural parameters of periphytic microalgae communities were affected by temperature, especially above 21 °C, in the same way as communities exposed to PSII-inhibitor herbicides. As they constitute most of the periphytic communities, the structure and composition of the diatoms contribute majorly to the response of the microalgal community to contamination. This suggests that the sensitivity of algal communities to these chemicals might depend on the sampling period (seasons) and the bioclimatic characteristics. Finally, this shows that the assessment of the effect of herbicides must take into account environmental specificities that modulate toxicity. In a context of herbicide risk assessment, integrating the co-effects of environmental parameters (i.e. temperature, light and nutrients) that influence the dynamics, structure and composition of the microalgal community appears to be crucial to enhance the environmental relevance of models and quality thresholds.

Acknowledgments

This program was carried out as part of the IMPALAC program, funded by the French Ministry of the Environment. It was also partly supported by the “Potomac” program, funded by the French National Research Agency (ANR).

The authors would like to thank the anonymous reviewers for helping them to improve the manuscript.

References

- ASTM International, 2007. Standard Guide for Conducting Static Toxicity Tests with Microalgae. Designation: E1218-04, p. 14.
- Admiraal, W., 1977. Influence of light and temperature on the growth rate of estuarine benthic diatoms in culture. *Mar. Biol.* 39, 1–9.
- Baulch, H.M., Schindler, D.W., Turner, M.A., Findlay, D.L., Paterson, M.J., Vinebrooke, R.D., 2005. Effects of warming on benthic communities in a boreal lake: implications of climate change. *Limnol. Oceanogr.* 50, 1377–1392.
- Bérard, A., Benninghoff, C., 2001. Pollution-induced community tolerance (PICT) and seasonal variations in the sensitivity of phytoplankton to atrazine in nanocosms. *Chemosphere* 45, 427–437.
- Bérard, A., Leboulanger, C., Pelte, T., 1999. Tolerance of *Oscillatoria limnetica* Lemmermann to Atrazine in natural phytoplankton populations and in pure culture: influence of season and temperature. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 37, 472–479.
- Biggs, B.J.F., Stevenson, R.J., Lowe, R.L., 1998. A habitat matrix conceptual model for stream periphyton. *Arch. Hydrobiol.* 143, 21–56.
- Blanchoud, H., Moreau-Guigon, E., Farrugia, F., Chevreuil, M., Mouchel, J.M., 2007. Contribution by urban and agricultural pesticide uses to water contamination at the scale of the Marne watershed. *Sci. Total Environ.* 375, 168–175.
- Boivin, M.E.Y., Massieux, B., Breure, A.M., Van den Ende, F.P., Greve, G.D., Rutgers, M., Admiraal, W., 2005. Effects of copper and temperature on aquatic bacterial communities. *Aquat. Toxicol.* 71, 345–356.
- Bonet, N., Corcoll, N., Acuña, V., Sigg, L., Behra, R., Guasch, H., 2013. Seasonal changes in antioxidant enzyme activities of freshwater biofilms in a metal polluted Mediterranean stream. *Sci. Total Environ.* 444, 60–72.
- Boulêtreau, S., Salvo, E., Lyautey, E., Mastroioli, A., Garabetian, F., 2012. Temperature dependence of denitrification in phototrophic river biofilms. *Sci. Total Environ.* 416, 323–328.
- Butterwick, C., Heaney, S.I., Talling, J.F., 2005. Diversity in the influence of temperature on the growth rates of freshwater algae, and its ecological relevance. *Freshwater Biol.* 50, 291–300.

- Cairns Jr., J., Buikema Jr., A.L., Heath, A.G., Parker, B.C., 1978. Effects of temperature on aquatic organism sensitivity to selected chemicals. Virginia Water Resour. Center, Bull., 106.
- Chalifour, A., Juneau, P., 2011. Temperature-dependent sensitivity of growth and photosynthesis of *Scenedesmus obliquus*, *Navicula pelliculosa* and two strains of *Microcystis aeruginosa* to the herbicide atrazine. *Aquat. Toxicol.* 103, 9–17.
- Chen, M., Li, J., Dai, X., Sun, Y., Chen, F., 2011. Effect of phosphorus and temperature on chlorophyll a contents and cell sizes of *Scenedesmus obliquus* and *Microcystis aeruginosa*. *Limnology* 12, 187–192.
- Coles, J.F., Jones, R.C., 2000. Effect of temperature on photosynthesis-light response and growth of four phytoplankton species isolated from a tidal freshwater river. *J. Phycol.* 36, 7–16.
- Davison, I.R., 1991. Environmental effects on algal photosynthesis: temperature. *J. Phycol.* 27, 2–8.
- DeNicola, D.M., 1996. Periphyton responses to temperature at different ecological levels. In: Stevenson, R.J., Bothwell, M.L., Lowe, R.L. (Eds.), *Algal Ecology: Freshwater Benthic Ecosystems*. Academic Press, San Diego, pp. 149–180.
- Debenest, T., Pinelli, E., Coste, M., Silvestre, J., Mazzella, N., Madigou, C., Delmas, F., 2009. Sensitivity of freshwater periphytic diatoms to agricultural herbicides. *Aquat. Toxicol.* 93, 11–17.
- Debenest, T., Silvestre, J., Coste, M., Pinelli, E., 2010. Effects of pesticides on freshwater diatoms. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 203, 87–103.
- Di Pippo, F., Ellwood, N.T.W., Guzzon, A., Siliato, L., Micheletti, E., De Philippis, R., Albertano, P.B., 2012. Effect of light and temperature on biomass, photosynthesis and capsular polysaccharides in cultured phototrophic biofilms. *J. Appl. Phycol.* 24, 211–220.
- Dorigo, U., Bourrain, X., Bérard, A., Leboulanger, C., 2004. Seasonal changes in the sensitivity of river microalgae to atrazine and isoproturon along a contamination gradient. *Sci. Total Environ.* 318, 101–114.
- El-Sabaawi, R., Harrison, P.J., 2006. Interactive effects of irradiance and temperature on the photosynthetic physiology of the pinnate diatom *pseudo-Nitzschia granii* (Bacillariophyceae) from the northeast subarctic pacific. *J. Phycol.* 42, 778–785.
- Fiori, E., Mazzotti, M., Guerrini, F., Pistocchi, R., 2013. Combined effects of the herbicide terbutylazine and temperature on different flagellates from the Northern Adriatic Sea. *Aquat. Toxicol.* 128–129, 79–90.
- Gilliom, R.J., 2007. Pesticides in U.S. streams and groundwater. *Environ. Sci. Technol.* 41, 3409–3414.
- Guasch, H., Sabater, S., 1998. Light history influences the sensitivity to atrazine in periphytic algae. *J. Phycol.* 34, 233–241.
- Guasch, H., Munoz, I., Rosés, N., Sabater, S., 1997. Changes in atrazine toxicity throughout succession of stream periphyton communities. *J. Appl. Phycol.* 9, 137–146.
- Hancke, K., Glud, R.N., 2004. Temperature effects on respiration and photosynthesis in three diatom-dominated benthic communities. *Aquat. Microb. Ecol.* 37, 265–281.
- Knauer, S., Escher, B., Singer, H., Hollender, J., Knauer, K., 2008. Mixture toxicity of three photosystem II inhibitors (atrazine, isoproturon, and diuron) toward photosynthesis of freshwater phytoplankton studied in outdoor mesocosms. *Environ. Sci. Technol.* 42, 6424–6430.
- Knauer, S., Dawo, U., Hollender, J., Hommen, U., Knauer, K., 2009. Effects of photosystem II inhibitors and their mixture on freshwater phytoplankton succession in outdoor mesocosms. *Environ. Toxicol. Chem.* 28, 836–845.
- Larras, F., Bouchez, A., Rimet, F., Montuelle, B., 2012. Using bioassays and species sensitivity distributions to assess herbicide toxicity towards benthic diatoms. *PLoS One* 7 (8), e44458.
- Larras, F., Montuelle, B., Bouchez, A., 2013. Assessment of toxicity thresholds in aquatic environments: does benthic growth of diatoms affect their exposure and sensitivity to herbicides? *Sci. Total Environ.* 463–464, 469–477.
- Loos, R., Gawlik, B.M., Locoro, G., Rimaviciute, E., Contini, S., Bidoglio, G., 2009. EU-wide survey of polar organic persistent pollutants in European river waters. *Environ. Pollut.* 157, 561–568.
- Magnusson, M., Heimann, K., Negri, A.P., 2008. Comparative effects of herbicides on photosynthesis and growth of tropical estuarine microalgae. *Mar. Pollut. Bull.* 56, 1545–1552.
- Ortelli, D., Edder, P., Klein, A., Ramseier Gentile, S., 2012. Metals and organic micropollutants in Geneva Lake waters. *Rapp. Comm. Int. Prot. Eaux. Léman Contre Pollut., Campagne 2011*, 51–66.
- Passy, S.I., 2008. Continental diatom biodiversity in stream benthos declines as more nutrients become limiting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 9663–9667.
- Péres, F., Florin, D., Grollier, T., Feurtet-Mazel, A., Coste, M., Ribeyre, F., Ricard, M., Boudou, A., 1996. Effects of the phenylurea herbicide isoproturon on periphytic diatom communities in freshwater indoor microcosms. *Environ. Pollut.* 94, 141–152.
- Pesce, A., Lambert, A.S., Neyra, M., Montuelle, B., 2012. Temperature Influence on Aquatic Microbial Community. Influence de la thermie sur les Communautés Microbiennes Aquatiques. Report IRSTEA-INRA, Microtherm Program (Thermic Study of Rhône, Phase 4), 19 pp.
- Pesce, S., Batisson, I., Bardot, C., Fajon, C., Portelli, C., Montuelle, B., Bohatier, J., 2009. Response of spring and summer riverine microbial communities following glyphosate exposure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 1905–1912.
- Pesce, S., Lissalde, S., Lavieille, D., Margoum, C., Mazzella, N., Roubeix, V., Montuelle, B., 2010. Evaluation of single and joint toxic effects of diuron and its main metabolites on natural phototrophic biofilms using a pollution-induced community tolerance (PICT) approach. *Water Res.* 44 (4), 1941–1949.
- Pesce, S., Bouchez, A., Montuelle, B., 2011. Effects of organic herbicides on phototrophic microbial communities in freshwater ecosystems. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 214, 87–124.
- Porsbring, T., Backhaus, T., Johansson, P., Kuylenstierna, M., Blanck, H., 2010. Mixture toxicity from photosystem II inhibitors on microalgal community succession is predictable by concentration addition. *Environ. Toxicol. Chem.* 29, 2806–2813.
- Rao, T.S., 2010. Comparative effect of temperature on biofilm formation in natural and modified marine environment. *Aquat. Ecol.* 44, 463–478.
- Reay, D.S., Nedwell, D.B., Priddle, J., Ellis-Evans, J.C., 1999. Temperature dependence of inorganic nitrogen uptake: reduced affinity for nitrate at suboptimal temperatures in both algae and bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2577–2584.
- Rhee, G.Y., Gotham, I.J., 1981. The effect of environmental factors on phytoplankton growth: temperature and the interactions of temperature with nutrient limitation. *Limnol. Oceanogr.* 26, 635–648.
- Roubeix, V., Mazzella, N., Delmas, F., Coste, M., 2010. In situ evaluation of herbicide effects on the composition of river periphytic diatom communities in a region of intensive agriculture. *Life Environ.* 60, 233–241.
- Roubeix, V., Mazzella, N., Schouler, L., Fauvel, V., Morin, S., Coste, M., Delmas, F., Margoum, C., 2011. Variations of periphytic diatom sensitivity to the herbicide diuron and relation to species distribution in a contamination gradient: implications for biomonitoring. *J. Environ. Monit.* 13, 1768–1774.
- Rumeau, A., Coste, M., 1988. Introduction into the systematic of freshwater diatoms, for a useful generic diatomic index. *Bull. Fr. Peche. Piscicult* 309, 1–69.
- Schmitt-Jansen, M., Altenburger, R., 2005. Toxic effects of isoproturon on periphyton communities—a microcosm study. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 62, 539–545.
- Schuler, L.J., Rand, G.M., 2008. Aquatic risk assessment of herbicides in freshwater ecosystems of south Florida. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 54, 571–583.
- Seguin, F., Leboulanger, C., Rimet, F., Druart, J.C., Berard, A., 2001. Effects of atrazine and nicosulfuron on phytoplankton in systems of increasing complexity. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 40, 198–208.
- Souffreau, C., Vanormelingen, P., Van de Vijver, B., Isheva, T., Verleyen, E., Sabbe, K., Vyverman, W., 2013. Molecular evidence for distinct antarctic lineages in the cosmopolitan terrestrial diatoms *Pinnularia borealis* and *Hantzschia amphioxys*. *Protist* 164, 101–115.
- Staehr, P.A., Sand-Jensen, K., 2006. Seasonal changes in temperature and nutrient control of photosynthesis, respiration and growth of natural phytoplankton communities. *Freshwater Biol.* 51, 249–262.
- Stenger-Kovacs, C., Padisak J., Biro, P., 2006. Temporal variability of *Achnanthes minutissimum* (Kützinger) Czarnecki and its relationship to chemical and hydrological features of the Tornastram, Hungary. In: *Proceedings of the 6th International Symposium on use of Algae for Monitoring Rivers*, Hungary, Balatonfüred, 12–16 September 2006.
- Tang, J., Hoagland, K.D., Siegfried, B., 1998. Uptake and bioconcentration of atrazine by selected freshwater algae. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 1085–1090.
- Ulrich, U., Dietrich, A., Fohrer, N., 2013. Herbicide transport via surface runoff during intermittent artificial rainfall: a laboratory plot scale study. *Catena* 101, 38–49.
- Van der Grinten, E., Janssen, A.P.H.M., De Mutsert, K., Barranguet, C., Admiraal, W., 2005. Temperature- and light-dependent performance of the cyanobacterium *Leptolyngbya foveolarum* and the diatom *Nitzschia perminuta* in mixed biofilms. *Hydrobiologia* 548, 267–278.
- Villanueva, V.D., Font, J., Schwartz, T., Romani, A.M., 2011. Biofilm formation at warming temperature: acceleration of microbial colonization and microbial interactive effects. *Biofouling* 27, 59–71.
- Villeneuve, A., Bouchez, A., Montuelle, B., 2011. In situ interactions between the effects of season, current velocity and pollution on a river biofilm. *Freshwater Biol.* 56, 2245–2259.
- Vinebrooke, R.D., Cottingham, K.L., Norberg, J., Scheffer, M., Dodson, S.I., Maberly, S.C., Sommer, U., 2004. Impacts of multiple stressors on biodiversity and ecosystem functioning: the role of species co-tolerance. *Oikos* 104, 451–457.
- Wang, M.J., Wang, W.X., 2008. Temperature-dependent sensitivity of a marine diatom to cadmium stress explained by subcellular distribution and thiol synthesis. *Environ. Sci. Technol.* 42, 8603–8608.